

Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen

In vitro Evaluation donorspezifischer Transplantattoleranz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Engels, Anne-Cathrin

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. N. Heyne

Tag der Disputation: 14.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Abstoßung und Effektormechanismen	2
1.1.1	T-Zell-Rezeptor.....	3
1.1.2	Kostimulation	4
1.1.3	Zytokinstimulation	5
1.2	Toleranzmechanismen	6
1.2.1	Chimärismus.....	6
1.2.2	Regulatorische T-Zellen.....	9
1.2.3	Dendritische Zellen (DC).....	12
1.2.4	Intrinsische hepatogene Toleranz.....	12
1.3	Toleranznachweise	14
1.4	Fragestellung.....	15
2	Material	15
2.1	Kryokonservierung der Milzzellen.....	15
2.2	Auftauen der Milzzellen	16
2.3	PBMC-Kultivierung aus Blut	17
2.4	MLC/Färbung	17
3	Methoden.....	17
3.1	Studienpopulation.....	18
3.2	Zeitlicher Ablauf.....	19
3.3	Spender-Milzzellisolierung und Kryokonservierung (Zielzellen)	20
3.4	Auftauen der Milzzellen	21
3.5	PBMC-Kultivierung aus Blut (Effektorzellen)	22
3.6	Gemischte Lymphozytenkultur (<i>Mixed Lymphocyte Culture</i> MLC)	23

3.7	FACS-Analyse.....	23
3.8	Interleukin-ELISA	25
3.9	Statistische Analyse	25
4	Ergebnisse.....	25
4.1	Evaluation des Tests	25
4.1.1	Effektor- und Ziellzellzahlen.....	25
4.1.2	Zytokinprofile	29
4.2	Abstoßungsdiagnostik	35
4.2.1	Transaminasenaktivität im Serum.....	35
4.2.2	Klinische Dokumentation	41
4.3	Immunsuppressionsregime	44
5	Diskussion	49
6	Zusammenfassung	58
7	Abkürzungen.....	59
8	Literaturverzeichnis.....	61
9	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ontologische Einteilung der regulatorischen T-Zellen.	10
Tabelle 2 Der Lebertransplantation zu Grunde liegende Erkrankungen.	18

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mögliche Differenzierung naiver T-Zellen.	3
Abbildung 2 Zeitlicher Ablauf des Experiments	19
Abbildung 3 Schema einer FACS-Messung nach DIO- und PI-Färbung	24
Abbildung 4 Verlauf der Mittelwerte und SEM der absoluten PBMC-Zahl in MLC-3, MLC-a und MLC-t.	26
Abbildung 5 Mittelwerte und SEM des PBMC-Anteils in der MLC-t an der Gesamtzellzahl bei Patienten mit und ohne stattgehabte Abstoßung.	27
Abbildung 6 Mittelwerte und SEM der absoluten Milzzellzahlen in MLC-3, MLC- a und MLC-t.	28
Abbildung 7 Mittelwerte und SEM der TNF- -Konzentration in MLC-3, MLC-a und MLC-t.	29
Abbildung 8 Mittelwerte und SEM der IFN- -Konzentration in MLC-3, MLC-a und MLC-t.	30
Abbildung 9 Mittelwerte und SEM der IL-6-Konzentration in MLC-3, MLC-t und MLC-a.	31
Abbildung 10 Mittelwerte und SEM der IL-8-Konzentrationen in MLC-a, MLC-3 und MLC-t.	32
Abbildung 11 Verlauf der Mittelwerte von Interleukin 10 in den Kulturen MLC-3, MLC-a und MLC-t für alle Patienten.	33
Abbildung 12 Mittelwerte von IL-10 in MLC-3, MLC-a und MLC-t unter Ausschluss der Patienten 1 und 19.	34
Abbildung 13 Mittelwerte von IL-2 in der MLC-t für Patienten mit GPT-Erhöhung und für Patienten ohne GPT-Erhöhung.	36
Abbildung 14 Verlauf der Mittelwerte der IL-2-Konzentration in der MLC-t und der MLC-3 bei Patienten mit und ohne GPT-Erhöhung.	37

Abbildung 15 Verlauf der Mittelwerte der IL-8-Konzentration in der MLC-t bei Patienten mit GPT-Erhöhung und ohne GPT-Erhöhung.	38
Abbildung 16 Mittelwerte und SEM der IL-8-Konzentrationen in den MLC-t der Patienten mit und ohne GOT-Erhöhung.	40
Abbildung 17 Verlauf der Mittelwerte und SEM von IL-2 in MLC-3 und MLC-t bei den Patientengruppen GOT erhöht (n=9) und GOT normwertig (n=14)	41
Abbildung 18 Mittelwerte und SEM der PBMC-Anzahl in den MLC-t über 6 Tage für Patienten mit und ohne klinisch stattgehabte Abstoßung.....	42
Abbildung 19 Mittelwerte und SEM der Anzahl der Milzzellen in der MLC-t für Patienten nach Abstoßung und für Patienten ohne Abstoßung.....	43
Abbildung 20 Mittelwerte und SEM der TNF- -Konzentration in MLC-t und MLC-3 gruppiert nach CNI-Medikation.	44
Abbildung 21 Mittelwerte und SEM der IFN- -Konzentration in MLC-3 und MLC-t gruppiert nach CNI-Medikation.....	45
Abbildung 22 Mittelwerte und SEM der IL-2-Konzentration in MLC-3 und MLC-t für Patienten mit Calcineurininhibitormedikation (links) und ohne (rechts).	46

1 Einleitung

Bei einer allogenen Transplantation werden genetisch fremde Zellen in den Empfängerorganismus derselben Spezies übertragen. Es wurde beobachtet, dass die beiden Zellgruppen in einem Organismus koexistieren können. Die Immunzellen des Spenders werden in diesen Fällen nicht zerstört, sondern migrieren in Gewebe und Blut des Empfängers. Dieser Zustand wird Chimärismus genannt und ist mit Toleranz assoziiert [1].

Toleranz wird definiert als die Abwesenheit einer pathologischen Immunantwort gegen ein Transplantat in einem immunkompetenten Empfänger ohne immunsuppressive Therapie und mit erhaltener protektiver Immunantwort gegen Antigene Dritter [2]; d.h. der Empfänger reagiert nicht pathologisch auf das transplantierte Organ, wohl aber auf völlig fremde Antigene. In der aktuelleren Literatur wird manchmal weiter zwischen echter Toleranz und *Spontaneous Operational Tolerance* (SOT) unterschieden. Bei der echten Toleranz ist keine schädliche Immunantwort detektierbar, bei der spontan operationalen Toleranz sind hingegen nur keine klinischen Auswirkungen messbar. Die SOT entspricht also der obigen Definition. Operational tolerante Empfänger haben dementsprechend ohne Immunsuppression auch eine stabile Transplantatfunktion, aber ggf. messbare Immunantworten. Die SOT wird in der Regel zufällig, d.h. durch mangelnde Kooperation der Patienten bei der Medikamenteneinnahme oder durch Absetzen der Immunsuppressiva bei schwerwiegenden Nebenwirkungen entdeckt [3, 4].

Tolerante Organempfänger können ohne die riskante Absetzung der Immunsuppression noch nicht zuverlässig identifiziert werden. Daher sind Immunsuppressiva derzeit nach Organtransplantationen unverzichtbar, um das Risiko einer Abstoßung möglichst gering zu halten. Dazu ist in der Regel eine tägliche immunsuppressive Basistherapie notwendig, die die Lebensqualität der Patienten einschränkt und oft mit erheblichen Nebenwirkungen und erhöhter Morbidität und Mortalität einhergeht. Die Therapie begünstigt Infektionen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Organschäden, Stoffwechselstörungen und Neoplasien und beeinträchtigt die Langzeitfunktion des Transplantats [5-7].

Mazariegos et al. zeigten, dass viele Lebertransplantierte eher überimmunsupprimiert sind und von einer frühen Reduktion der Medikamente profitieren würden, da insbesondere Hypertonus und Nierenschäden nicht reversibel sind [8].

Da es bisher nicht gelungen ist, Toleranz stabil zu induzieren, ist es also sinnvoll, eine wenig invasive Methode zu entwickeln, mit der man (Nicht-)Reaktivität zwischen Empfänger und allogenen Transplantat messen kann, um tolerante Empfänger bzw. Empfänger mit niedrigem immunologischen Risiko zu selektieren und so die Immunsuppression kontrolliert reduzieren oder gar absetzen zu können, ohne das Transplantat zu gefährden. Außerdem wird die Toleranz-Evaluation zur Überwachung und Beurteilung von Toleranzinduktionsschemata benötigt.

Empfänger eines Lebertransplantats sind unter den Organtransplantierten besonders gut für Studien zur Reduzierung von Immunsuppressiva und Toleranzmessung geeignet.

Starzl und Marchioro beschrieben schon 1963 für Nierentransplantierte, dass akute Abstoßungsreaktionen unter höherdosierter Immunsuppression reversibel sind [9]. Lebertransplantierte profitieren aber zusätzlich von der außerordentlichen hepatischen Regenerationsfähigkeit, sodass sogar frühe Formen der chronischen Abstoßung noch reversibel sind und vollständig ausheilen können. Weil auch die in der Klinik gängigen Leberfunktionstests sensitivere Indikatoren für einen Organschaden (nicht jedoch spezifisch für eine Abstoßung) sind als andere Organfunktionstests (z.B. Lungenfunktionstest für die Abstoßung eines Lungentransplantats oder Kreatininbestimmung für die Abstoßung einer Niere), ist eine vergleichsweise risikoarme Entwöhnung von der immunsuppressiven Therapie bei Lebertransplantierten möglich [10-16].

1.1 Abstoßung und Effektormechanismen

Nach der Transplantation induziert das transplantierte Gewebe die Proliferation alloreaktiver T-Zell-Klone.

Für die Aktivierung einer naiven T-Zelle sind ganz allgemein drei verschiedene Signale notwendig. Es handelt sich dabei um die Aktivierung mittels TCR

(T-Zell-Rezeptor), Kostimulation und Zytokinstimulation.

Unter kostimulatorischem Einfluss und in Abhängigkeit des Zytokinmilieus können sich naive Zellen in unterschiedliche Subpopulationen differenzieren (Abbildung 1).

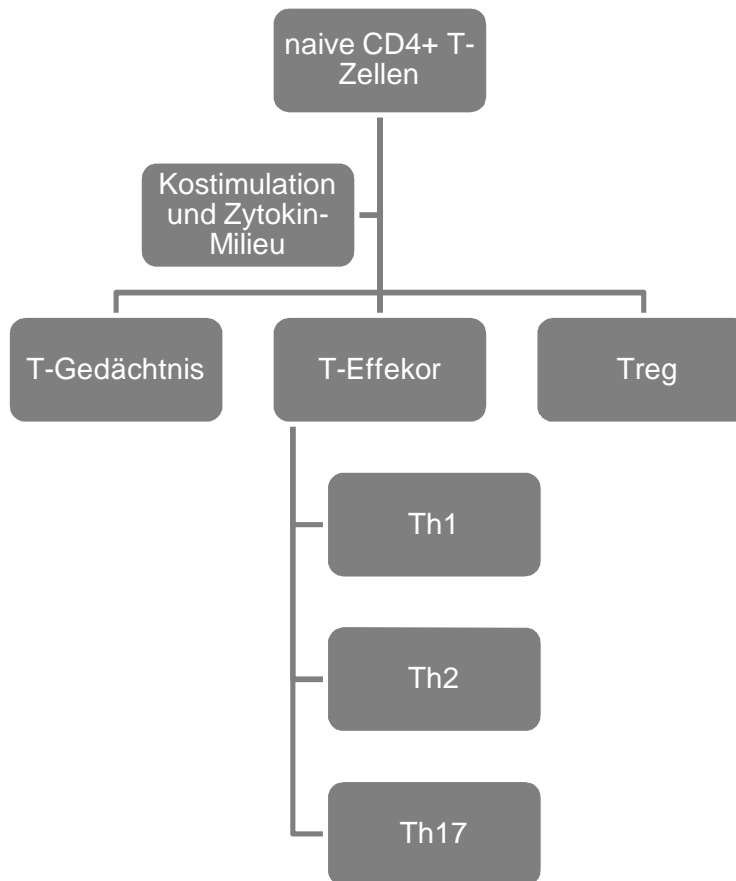


Abbildung 1
Mögliche Differenzierung naiver T-Zellen unter Kostimulation zu T-Gedächtnis-, T-Effektor- und regulatorischen T-Zellen. T-Effektorzellen beinhalten insbesondere die Th1-, Th2- und Th17-Subpopulation.

1.1.1 T-Zell-Rezeptor

Die Antigenerkennung mittels TCR (T-Zell-Rezeptor) kann direkt oder indirekt erfolgen. T-Zellen, die Spenderantigene auf die eine oder andere Art erkennen, können Abstoßung vermitteln. Im Rahmen der **direkten Erkennung** migrieren antigenpräsentierende Zellen (APC) des Spenders aus dem Transplantat in die sekundären lymphatischen Organe und präsentieren dort den naiven T-Zellen und zentralen T-Gedächtnis-Zellen des Empfängers ihr fremdes MHC I oder

MHC II von Transplantatzellen oder Passengerleukozyten. Es werden sowohl CD8+ als auch CD4+ T-Zellen aktiviert. In der Folge sezernieren die CD4+ Zellen v.a. IL-2, IFN- und TNF- , die die Proliferation zytotoxischer T-Zellen fördern und eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Der direkte Weg ist wahrscheinlich der dominante Mechanismus für die akute Abstoßung, lässt sich aber nicht streng von der indirekten Erkennung trennen. Das Transplantat kann auch unmittelbar (also unabhängig von APCs und sekundär lymphatischem Gewebe) durch Effektor-T-Zellen und frisch aktivierte T-Zellen des Empfängers erkannt werden. Die alloreaktiven Effektorzellen können zum Zeitpunkt der Transplantation schon präsent sein, z.B. durch Antigenkontakt in der Schwangerschaft oder durch Bluttransfusionen. Es gibt aber auch in hohem Maße TCR-Kreuzreaktivität zwischen viralen Epitopen und Alloantigenen. Bei der **indirekten Erkennung** präsentieren Empfänger-APC die aufgenommenen Spender-Proteine. Das TCR-Signal initiiert die T-Zell-Aktivierung und definiert die Spezifität der Alloimmunantwort, ist aber für eine effiziente Antwort unzulänglich. Für Überleben, Differenzierung und klonale Expansion aktivierter T-Zellen ist zusätzlich ein kostimulatorisches Signal erforderlich [17, 18].

1.1.2 Kostimulation

Grundsätzlich sind für eine suffiziente T-Zell-Antwort neben dem TCR-Signal ein oder mehrere antigenunabhängige kostimulatorische Signale notwendig. Dieses Signal entscheidet während und auch nach der initialen Aktivierung der T-Zelle über die endgültige T-Zell-Antwort. Unter kostimulatorischem Einfluss erfolgt auch die Transition von T-Effektorzellen zu T-Gedächtniszellen oder die Reaktivierung präexistenter Gedächtniszellen [19].

In Bezug auf die Wirkung auf T-Effektorzellen werden positive und negative kostimulatorische Signale unterschieden. Positive Signale treiben Aktivierung, Überleben und Differenzierung von T-Effektorzellen voran oder bilden bzw. reaktivieren T-Gedächtniszellen; es werden verschiedenste Moleküle aus der Ig-, der TNF/TNFR- und der TIM-Familie dazugezählt. Negative kostimulatorische Moleküle hingegen antagonisieren das TCR-vermittelte Signal. Es werden laufend neue Moleküle und Mechanismen entdeckt.

Unübersichtlich und in gewisser Weise unvorhersehbar wird das kostimulatorische Geschehen vor allem dadurch, dass die gleiche Rezeptor-Ligand-Interaktion unterschiedliche und sogar entgegengesetzte Auswirkungen auf die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen haben kann. Außerdem können einige kostimulatorische Moleküle in Abhängigkeit vom Milieu und der T-Zell-Subpopulation sehr variabel exprimiert sein [20].

Exemplarisch wird hier auf die zwei am längsten bekannten kostimulatorischen Moleküle CD28 und CTLA4 eingegangen.

CD28 ist ein positives kostimulatorisches Molekül aus der Ig-Familie, das auf allen naiven CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vorhanden ist. Bindet CD28 an einen seiner APC-Liganden (B7-1, CD80, B7-2, CD86), werden das TCR-Signal optimiert und die IL-2-Produktion, die klonale Expansion und die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen getriggert. Die Bindung verhindert Apoptose. Eine Aktivierung via TCR ohne CD28 endet im Gegensatz dazu in T-Zell-Anergie. Die CD28/B7-Interaktion stellt einen Schlüsselsignalweg der Effektor-T-Zell-Antwort dar. Der CD28-Ligand B7 wird von APC und aktivierten T-Zellen exprimiert [19, 20].

Im Gegensatz dazu ist CTLA4 ein negatives kostimulatorisches Molekül, das die Alloimmunität limitiert und Toleranz fördert. Der CTLA4-Ligand CD152 bindet genau wie CD28 B7, CD80 und CD86, allerdings mit einer 10- bis 20-fach höheren Affinität als CD28. Da die Bindung ein inhibitorisches Signal an die T-Zelle liefert, ist es wichtig für die Induktion von Anergie. CTLA4 wird von aktivierten T-Zellen und konstitutiv von Foxp3⁺ Zellen exprimiert. Initial ist also eine Antigenerkennung für die Entstehung von Anergie und somit in der Folge evtl. Toleranz nötig [19-21].

1.1.3 Zytokinstimulation

Für eine antigenspezifische Antwort benötigen naive CD8⁺ Zellen neben dem TCR- und kostimulatorischen Signal ein (möglicherweise redundantes) drittes Signal. Dies sind in der Regel CD4-Zell vermittelte Signale. Zum Beispiel reagieren naive CD8⁺ Zellen auf von CD4⁺ Zellen sezerniertes IL-2 mit der Differenzierung zu CD8-Gedächtniszellen oder . Effektorzellen. IL-12 und

IFN Typ1 bewirken eine starke klonale Expansion und zytolytische Funktion der CD8+ Zellen [19].

1.2 Toleranzmechanismen

Um einen toleranten Zustand zu erreichen, können klassischerweise zellintrinsisch die Mechanismen Ignoranz, Anergie, Deletion, der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) und das *Phenotypic Skewing*, zellextrinsisch die Regulation durch regulatorische T-Zellen und tolerogene dendritische Zellen greifen [22]. Für die Toleranz von Lebertransplantaten gibt es aber Experimente, die zeigen, dass Toleranz eher nicht auf Ignoranz, sondern im Gegenteil auf einen aktiven Prozess aus T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Transplantatinfiltration zurückzuführen ist und weitere leberspezifische Mechanismen miteinzubeziehen sind [23]. Versuche, ein allgemeingültiges Erklärungsmodell für die Organtoleranz zu finden, sind bisher gescheitert. Man geht viel eher davon aus, dass Toleranz ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen darstellt, das zusätzlich sowohl von der vorausgegangenen Exposition gegenüber Pathogenen des Empfängers beeinflusst wird, als auch genetischen Einflüssen unterliegt. Außerdem werden Mechanismen zur Toleranzinduktion und zur Aufrechterhaltung der Toleranz unterschieden.

1.2.1 Chimärismus

Im immunologischen Kontext versteht man unter dem Begriff Chimärismus, dass genetisch unterschiedliche Zellen in einem Organismus koexistieren. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Chimärismus mit Toleranz assoziiert ist [24].

Es wird unterschieden zwischen Makro- und Mikrochimärismus.

Makrochimärismus entsteht in der Regel nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation. Die pluripotenten Spenderzellen sezernieren im neuen Organismus alle Zelllinien, inklusive der des Immunsystems.

Mikrochimärismus ist hingegen das Ergebnis der Migration von Passengerleukozyten aus einem soliden Transplantat. Der Empfänger ist nicht wie im ersten Fall konditioniert und es werden nur hämatopoetische Abkömmlinge der Spenderzellen gebildet, die systemisch migrieren.

Passengerleukozyten umfassen NK, NKT, klassische CD4+- und CD8+-Zellen,

TCR- und T_{reg} sowie Kupffer-Zellen, Monozyten und verschiedene DC [25]. Die meisten Spenderleukozyten werden ca. 48h nach der Transplantation gemessen (bis zu 20% der zirkulierenden mononukleären Zellen). Mittels hochsensitiver Methoden wie der PCR konnte Chimärismus noch mehr als 10 Jahre nach der Transplantation nachgewiesen werden. Mikrochimärismus konnte bei bis zu 70% der Transplantierten nachgewiesen werden und findet sich nicht nur bei Lebertransplantation, sondern auch bei Lungen-, Herz- und Nierentransplantation [26]. Hinzu kommt, dass auch wenn kein Chimärismus nachgewiesen werden konnte, in mehreren Experimenten zumindest eine Hyporesponsivität in vitro gemessen wurde [27]. Warum die Leukozyten das Transplantat überhaupt verlassen, ist nicht geklärt. Erklärungsansätze reichen von großen Mengen TNF- im Transplantat über durch Kältekonservierung geschädigte Adhäsionsmoleküle bis zur mechanischen Variante, dem Mobilisieren der Leukozyten durch die Reperfusion [26].

Darüber, wie genau dieser Mikrochimärismus Toleranz induziert, wird bis heute noch spekuliert. Die Passengerleukozyten sind Abkömmlinge von Knochenmarkzellen und antigen-präsentierende dendritische Leukozyten [28]. Möglicherweise aktivieren solche Donor-DC mit tolerogenen Eigenschaften über den direkten Weg T-Zellen und sezernieren Zytokine, die die Antwort herunterregulieren. Andere Passengerleukozyten induzieren eventuell den *death by neglect* alloreaktiver T-Zellen, indem sie die Empfänger-T-Zellen im lymphatischen Gewebe nur unzureichend aktivieren. Spenderleukozyten können aber auch zum Langzeit-Spenderzell-Mikrochimärismus führen. alloreaktive Empfänger-T-Zellen werden quasi antagonisiert [18]. Ein weiterer beschriebener Mechanismus, wie Chimärismus Toleranz induziert, ist über die Inaktivierung CD8-positiver Zellen [29].

Starzl postuliert, dass für eine erfolgreiche Transplantation zwei Mechanismen greifen müssen:

Zum einen die *clonal exhaustion-deletion*, d.h. Spenderantigen (z.B. in Form von Passengerleukozyten) migriert zu lymphatischem Gewebe und Spender- und Empfängerzellen verursachen ihre gegenseitige Erschöpfung. Sie werden daraufhin ausgelöscht. Donorzellen, die dieser Destruktion entkommen,

wandern nach Tagen oder Wochen in nicht-lymphatische Gewebe aus, die den Effektormechanismen des Empfängers relativ unzugänglich sind. Hier werden die Antigene ignoriert, vergessen oder wandern erneut in lymphatische Organe aus. Zum anderen ist für Starzl die Immunignoranz von zentraler Bedeutung, d.h. Antigene, die keine lymphatischen Gewebe erreichen, können nicht erkannt werden [30].

Einigkeit herrscht darüber, dass Zellen beider Immunsysteme koexistieren und quasi ein Hybrid-Immunsystem entsteht. Selbstreaktive und donorreaktive Zellen werden im Thymus durch negative Selektion eliminiert. Die Folge ist ein robuster, donorspezifisch toleranter Status im Empfängerorganismus [26].

Starke Argumente für die Chimärismus-These bei der Toleranzinduktion sind zum einen, dass thymektomierte Mäuse keine Toleranz induzieren können, zum anderen, dass durch künstlichen Chimärismus relativ stabil Toleranz induziert werden kann [26]. Ein weiteres Argument - zumindest für eine wichtige Rolle der zentralen Deletion - sind die Ergebnisse klinischer Studien mit lebertransplantierten Kindern, die gegenüber Erwachsenen überdurchschnittlich oft und lange ohne bzw. mit niedrigen Dosen Immunsuppressiva auskommen. Am ehesten ist dies auf den aktiven Thymus zurückzuführen.

Mikrochimärismus kann durch eine simultane nicht-myeloablative Knochenmarktransplantation herbeigeführt werden. Im Jahre 2008 zeigten Kawai et al. bei Nierentransplantierten, dass nur einer von fünf Patienten, die eine simultane Knochenmarktransplantation erhielten, eine irreversible Abstoßungsreaktion entwickelte. Die übrigen Patienten konnten ihre immunsuppressive Therapie sogar absetzen. Untersuchungen an diesen Patienten zeigten eine donorspezifische Nicht-Reaktivität ihrer T-Zellen [31]. Immunzellen des Spenders sind also offensichtlich am Toleranzgeschehen beteiligt. Yamakazi et al. zeigten Ähnliches für partiell MHC-kompatible Hauttransplantate im Mausmodell [29].

Diese Untersuchungen und auch schon viel frühere Annahmen von v.a. Billingham und Medawar aus dem Jahr 1953 [32] und die Bestätigung von Starzl [1, 33], dass Chimärismus mit Akzeptanz des Transplantats einhergeht,

gaben Anlass dazu, die Vorgänge im Rahmen des Milzzell-Chimärismus genauer zu untersuchen. Milzzellen stellen nämlich eine reiche Quelle an Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen dar und können Knochenmarkzellen ersetzen, somit also einen Chimärismus herstellen bzw. repräsentieren.

Da sich die weit verbreitete Ansicht, dass Chimärismus essentiell für die Toleranzinduktion ist, in verschiedenen Studien nicht eindeutig bestätigt hat [27], weil trotz Toleranz kein Chimärismus nachweisbar war, soll in diesen Experimenten nicht Chimärismus per se, sondern die Responsivität der beiden Immunsysteme gemessen werden.

1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Lange Zeit wurde das klassische und relativ simple Th1-Th2-Modell der dichotomen Cross-Regulation auf die Transplantatimmunologie angewendet, bei dem Th1- und Th2-Zellen sich gegenseitig inhibieren. Th1-Zellen sezernieren vor allem IFN- γ , das über Monozyten und Makrophagen eine Entzündungsreaktion hervorruft. Die Th2-Population vermittelt über IL-4, IL-5 und IL-10 die Antikörpersekretion [34]. Th1-Zellen aktivieren CD8⁺ Zellen zu zytotoxischen Lymphozyten (CTL) und expandieren die CD8⁺ T-Gedächtniszellpopulation während einer Resensibilisierung. Mit der Zeit wurde diese Theorie jedoch in Frage gestellt und gezeigt, dass die Immunantwort weitaus komplexer funktionieren muss und das Th1-Th2-Modell nicht alle Immunreaktionen ausreichend erklären kann. Van Buskirk zeigte beispielsweise, dass Th2-Zellen bei herztransplantierten Mäusen eine akute Abstoßung hervorrufen können, was bis dahin den Th1-Zellen als klassische Effektorzellen der Abstoßung zugesprochen wurde [35]. In den letzten Jahren wurden neue T-Zell-Subpopulationen entdeckt und das Th1-Th2-Paradigma musste um diese Unterarten und kostimulatorische Signalwege erweitert werden.

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) können die angeborene und erworbene Immunabwehr supprimieren und ihre Zielzelle während jeden Stadiums regulieren. Allgemein können sie Immunprozesse im Körper unterdrücken oder beschleunigen, so auch eine Abstoßungsreaktion. Nach Shalev [22] können T_{reg}

grob unterteilt werden in T_{reg} , die aus dem Thymus stammen und klassischerweise Foxp3+ sind (natürliche $T_{reg} = nT_{reg}$, Tabelle 1) und solche, die unter immunsupprimierten Bedingungen aus CD4+ oder CD8+ Zellen entstehen (induzierte $T_{reg} = iT_{reg}$). Sie beinhalten multiple weitere Untergruppen.

Tabelle 1
Ontologische Einteilung der regulatorischen T-Zellen in natürliche T_{reg} (nT_{reg}) und induzierte T_{reg} (iT_{reg}) mit ihren jeweils zugehörigen Zellgruppen nach Shalev.

nT_{reg}	iT_{reg}
CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg	Tr1-Zellen
NKT	CD8+ Treg
T-Zellen	Th3-Zellen
DNT	CD4+ CD25+ iTreg
CD8+ CD25+ Foxp3+ T-Zellen	Unterart von DNT
CD8+ CD45RC ^{low} Treg	
CD8+ CD122+ Treg	
TCR + Treg	
CD8 + Treg	

Ihre regulatorische Funktion üben T_{reg} allgemein aus indem sie entweder APC oder direkt die Aktivierung oder Effektormechanismen alloreaktiver T-Zellen beeinflussen. Durch Aktivierung des TLR werden die supprimierenden Eigenschaften der CD4+ CD25+ T_{reg} verstärkt [36]. Sie sezernieren IL-35, IL-10, fibrinogen-like Protein 2 und TGF- β , die die Immunantwort herunterregulieren und verbrauchen sogar IL-2 [19]. Außerdem exprimieren sie inhibitorische membranassoziierte Moleküle wie CTLA4 und Lymphocyte Activation Gene 3, welches über Reduzierung der APC-Aktivität auch die Aktivität der T-Effektorzellen senkt. Darüber hinaus induzieren sie Apoptose durch Produktion zytolytischer Effektormoleküle wie Granzyme A/B, Perforin und Galectin 1 und unterbrechen den Metabolismus der Zielzelle, indem sie den *second Messenger* cAMP supprimieren und den CD39/CD75-Signalweg inhibieren [22].

Zu den T_{reg} gehören unter anderem die anhand dieses Markers gut untersuchbaren Foxp3+ Zellen. Foxp3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein für regulatorische T-Zellen spezifischer Transkriptionsfaktor und Hauptregulator für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen [22]. Es supprimiert die Funktion von NFAT und NF- κ B und unterdrückt so die Genexpression verschiedener T-Effektorzell-Zytokine, u.a. IL-2. Andererseits aktiviert es CTLA4. Durch Antigen-Priming bilden sich aus den naiven Foxp3+ Zellen Gedächtnis-Foxp3+-Zellen, die sehr effektiv die T-Effektorzellen unterdrücken können [37].

Induzierte T_{reg}s neigen im Gegensatz zu natürlichen T_{reg}s mehr dazu, ihre Foxp3-Expression zu verlieren und zu Effektorzellen zu werden. Es gibt Hinweise, dass diese Instabilität v.a. durch die inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α gefördert wird [20]. IL-10 hingegen erhöht in vivo die Foxp3-mRNA und reguliert das proinflammatorische TNF- α herunter [21].

Die Depletion regulatorischer T-Zellen durch einen anti-CD25-Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation zeigte, dass CD25+ und damit vermutlich CD4+ T_{reg} vor allem für die Toleranzinduktion und weniger für die Aufrechterhaltung erforderlich sind. Zur Toleranzaufrechterhaltung scheinen andere als die CD4+ CD25+ Zellen erforderlich zu sein [18]. Während der Reduktion von Immunsuppressiva waren CD4+ CD25+ Zellen und Foxp3-mRNA bei operational toleranten Leberempfängern erhöht [38].

Von möglicher Relevanz im Gesamtkontext des Chimärismus ist es, zwischen T_{reg} des Empfängers und T_{reg} des Spenders zu unterscheiden. Die Depletion von Spender-T_{reg} beschleunigte im Mausmodell die Bildung von Chimärismus indem durch mangelnde Interaktion mit den Spender-T_{reg} die zytotoxischen CD8+ Zellen vermehrt aktiv waren. Eine Reduktion der Empfänger-T_{reg} vermindert das Transplantatüberleben, gesteigerte Empfänger-T_{reg} verlängern das Überleben ohne Immunsuppression, d.h. sie sind mit an einem toleranten Zustand beteiligt. Eine spätere Depletion regulatorischer T-Zellen zeigte keinen solchen Effekt mehr, T_{reg} sind also offensichtlich v.a. an der Induktionsphase beteiligt [29].

1.2.3 Dendritische Zellen (DC)

DC induzieren und regulieren als wesentliche Komponente des angeborenen Immunsystems Immunantworten, d.h. sie können auch wesentlich an T-Zell-Aktivierung bzw. an der T-Zell-Funktionsregulation beteiligt sein, was wiederum bedeutet, dass sie an koregulatorischen Signalwegen beteiligt sind. Sie können in myeloische und plasmazytoide DC (mDC und pDC) differenziert werden. pDC produzieren IFN- γ und sind prädisponiert, Toleranz zu induzieren. Es wurde gezeigt, dass erhöhte pDC im peripheren Blut ein Indikator für potentielle Patienten ist, die ihre Immunsuppressiva reduzieren können, bzw. erniedrigte pDC mit späterer Abstoßung einhergehen [39]. DC können andererseits aber auch Immunität bewirken. Wahrscheinlich sind sie Übersetzer und nicht Verursacher eines bestimmten Signalwegs [25].

1.2.4 Intrinsische hepatogene Toleranz

Lebertransplantate genießen unter den soliden Organtransplantaten immunologisch einen Sonderstatus. Lebertransplantierte benötigen nicht nur weniger Immunsuppressiva, das Transplantat selber wirkt auch protektiv für andere Organe vom selben Spender. Organtransplantationen, die mit einer Lebertransplantation kombiniert werden, zeigen ein besseres Überleben und weniger Abstoßungen. Auch hyperakute Abstoßungen werden bei Lebertransplantierten selbst bei positiver Kreuzprobe nur sehr selten beobachtet; eine positive Kreuzprobe kann innerhalb weniger Stunden nach Lebertransplantation sogar negativ werden [18, 40, 41]. Für diese Phänomene gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

Normalerweise können naive T-Zellen im Gegensatz zu T-Gedächtniszellen nur in sekundär lymphatischem Gewebe durch direkte und indirekte Antigenerkennung aktiviert werden, weil sie keine Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren besitzen, um in periphere Gewebe zu gelangen. Nach Aktivierung werden sie dann zu Effektorzellen [42].

Die Leber besitzt eine Vielzahl ansässiger Lymphozyten, die sich von peripheren Lymphozyten unterscheiden. Es handelt sich dabei v.a. um eine Unterart der NK-Zellen, die mit einem seltenen TCR-Glykolipid-Antigen (wie z.B. im MHC I Komplex enthalten) erkennen, und um klassische T-Zellen,

wovon die CD8+ Zellen überwiegen. Die Leber besitzt auch eigene semiprofessionelle APC. Darüber, wie genau diese lebereigenen, inkompetenten bzw. toleranten APC entstehen, herrscht noch keine Einigkeit in der Literatur. Ein Modell geht beispielsweise davon aus, dass die hepatischen DC bei insuffizienten Signalen in einem halbreifen Stadium verharren und Antigen präsentieren können, aber keine vollständigen kostimulatorischen Effekte haben und somit tolerogene Eigenschaften haben [25].

In der Leber können naive T-Zellen also primär aktiviert werden. Aufgrund ihrer Anatomie und Architektur ist die Leber ständig Endotoxinen aus dem Darm ausgesetzt. Sie reagiert darauf mit der Expression bestimmter APC, kostimulatorischer Signale und Moleküle, die eine T-Zell-Inaktivierung bewirken. Es kommt zur elektronenmikroskopisch nachweisbaren transendothelialen Hepatozyten-Lymphozyten-Interaktion (TEHLI) [43] und zur zellvermittelten Aktivierung durch Kupffer-Zellen und hepatische dendritische Zellen. Nach primärer hepatischer Aktivierung konnten LSEC (*liver sinusoidal endothelial cells*) und Hepatozyten antigenspezifische T-Zell-Toleranz induzieren, weil im Gegensatz zur Aktivierung in sekundär lymphatischem Gewebe nur inkompetente zytotoxische bzw. apoptotische T-Zellen entstehen, die in vitro durch IL-2 vor dem *death by neglect* gerettet werden können. *Death by neglect* ist eine antigenspezifische klonale Deletion leberinfiltrierender T-Zellen [18]. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass Hepatozyten tolerogene semiprofessionelle APC sind.

Via LSEC aktivierte CD4+ Zellen werden zu Effektorzellen, die IL-4, IFN- und in großen Mengen IL-10 sezernieren. Die klassische Aktivierung zu IL-2-sezernierenden TH2-Zellen bleibt aus. Die Aktivierung der CD8+ Zellen hat keinen zytotoxischen Effekt. Der tolerante Status ist in der Leber von IL-10 und TGF- β 1 dominiert [25].

Die intrinsische Toleranz erfolgt also im Wesentlichen über klonale Deletion und T_{reg}, weniger über Anergie oder Immundeviation. Immundeviation entspricht einem Toleranzmechanismus, in dem eine Immunantwort auftritt, die Effektormodalität aber das Antigen nicht entfernen kann. Immundeviation spielt eher bei Infektionen eine Rolle [25]. Unter dem Aspekt der hepatischen

tolerogenen Eigenschaften sollte man auch beachten, dass besonders die frühzeitigen immunsuppressiven Therapien nach Transplantation mit diesen Fähigkeiten der Leber, selbst Toleranz zu induzieren, möglicherweise interferieren. Ein Grund mehr, tolerante Patienten früh zu identifizieren.

1.3 Toleranznachweise

Einige Arbeitsgruppen haben das ultimative Ziel vor Augen, Toleranz als definitiven Zustand eines jeden Empfängers nachzuweisen. Unter diesem Gesichtspunkt scheinen die Polymorphismen von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, kostimulatorischen Molekülen und Rezeptoren am ehesten erfolgversprechend zu sein [39, 44]. Die Toag-1 Expression peripher und im Transplantat korreliert beispielsweise mit dem Transplantatüberleben [45]. Andere Arbeitsgruppen legen dagegen den Schwerpunkt auf die Erforschung regulatorischer Mechanismen und Zellen, z.B. Th17-Zellen, die das während akuter Abstoßungen erhöhte IL-17 produzieren. T-Zellfunktionstests verfolgen auch den nicht-statischen Toleranzansatz und korrelieren mit dem Immunstatus des Organempfängers [39]. Die Messung zirkulierender T_{reg} zeigte auch signifikante Ergebnisse, allerdings erst nach Absetzen der Immunsuppression [38]. Nach einer Übersichtsarbeit von Levitsky aus dem Jahr 2011 [44] sollen vor allem die Immunphänotypisierung peripherer Blutzellen wie FOXP3⁺ Zellen, das Verhältnis dendritischer Zellen zueinander und die T-Zellen (V_{1+}/V_{2-} -Verhältnis) vielversprechende Toleranzassays sein. Eine erhöhte Anzahl V_{1+} T-Zellen zusammen mit bestimmten Transkriptionsprofilen im peripheren Blut, prädominiert von TCR⁺ und NK-Zellen war in einer Studie aussagekräftig [45]. Desweiteren zählt Levitsky lösliches HLA-G sowie die genomischen Signaturen von NK-Zellen, T-Zellen, den Rezeptoren von CD8⁺-Zellen und Zytokinpolymorphismen von z.B. TNF- und IL-10 zu den vielversprechenden Ansätzen. Lösliches HLA-G (sHLA-G) korreliert mit normalen Leberfunktionstests bzw. einem sHLA-G-Abfall folgt eine Verschlechterung der Leberfunktionstests. Patienten mit hohen sHLA-G-Konzentrationen kurz nach Transplantation haben eine geringere Inzidenz von Abstoßungsepisoden[39]. Weniger vielversprechende Ansätze, da nicht aussagekräftig oder noch nicht ausreichend erforscht, beschäftigen sich u.a. mit

der Immunphänotypisierung des Transplantats (FOXP3-mRNA, das Verhältnis von Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen), der Hypersensitivität vom verzögerten Typ oder donorspezifischen Antikörpern und der HLA-Typisierung. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von MLCs auf diesem Gebiet lieferten u.a. Sakai et al., die das Immunsuppressionsregime anhand einer CFSE-MLR (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester-Mixed Lymphocyte Reaction*) optimierten oder Tanaka et al., die mit ihrer multiparametrischen MLC ebenfalls in Aussicht stellen, ein optimiertes Therapieregime konzipieren zu können [46, 47]. Eine weitere Arbeitsgruppe unterstrich mit einer MLC und der Konzentrationsmessung von IFN- γ , dass die HLA-Kompatibilität bei Nierentransplantation zur Vorbeugung von Abstoßungen bedeutender ist als bei Lebertransplantation, auch wenn kein donorspezifischer Zusammenhang festgestellt werden konnte [48]. Einen relativ simplen, jedoch vielversprechenden Ansatz verfolgen De La Garza et al. mit der Messung und Berechnung eines Lymphozytenstimulationsindex, der vereinfacht ausgedrückt die Reaktivität des Empfängerimmunsystems misst. In einer sehr selektierten Patientengruppe konnten hier signifikante Ergebnisse erzielt werden [49].

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob anhand eines Zytotoxizitätsassays aus Empfänger-PBMC und Spender-Milzzellen und der Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in unterschiedlich zusammengesetzten MLCs tolerante Lebertransplantatempfänger mittels lebender und vitaler Zellen und mittels unterschiedlicher Zytokinprofile identifiziert werden können.

2 Material

2.1 Kryokonservierung der Milzzellen

DMSO Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
Erlenmeyerkolben	Schott AG, Mainz

Falcontube 50ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ, USA
FCS Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Kryotube	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zählkammer nach Neubauer	Karl Hecht GmbH & Co AG, Sondheim
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Auftauen der Milzzellen

CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Moriguchi, Japan
DIO ₁₈₍₃₎	Sigma, St. Louis MO, USA
Falcontubes 15 ml und 50 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
Glutamin (N-Acetyl-Analyin-L-Glutamin)	Biochrom AG, Berlin
Hepes-Buffer 1 M	Biochrom AG, Berlin
Kulturplatte (Multiwell 24 well)	Becton, Dickonson and Company, Franklin Lakes NJ, USA
Mikroskop BH-2	Olympus, Tokio, Japan
Mikroskop Leica DM IRB	Leica, Bensheim
Phosphate buffered saline	Biochrom AG, Berlin
RPMI	Biochrom AG, Berlin
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA

2.3 PBMC-Kultivierung aus Blut

Concanavalin A	Sigma, St. Louis MO, USA
Falcontube	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Biocoll Trennlösung	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Hepes-Buffer 1 M	Biochrom AG, Berlin
Kulturplatte	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes NJ, USA
Monovette (Li-Heparinat)	Sarstedt, Nümbrecht
Phosphate buffered saline	Biochrom AG, Berlin
Pipette	Sigma, St. Louis MO, USA
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA

2.4 MLC/Färbung

Propidiumiodid (PI)	Sigma, St. Louis MO, USA
---------------------	--------------------------

3 Methoden

In diesem donorspezifischen Zytotoxizitätsassay soll FACS-analytisch gemessen werden, wie sich periphere Empfängerblutzellen (PBMC) und Spendermilzzellen unter ein- bis sechstägiger gegenseitiger Antigenstimulation entwickeln. Anhand zweier Färbungen (PI und DIO) können jeweils avitale und vitale PBMC und Milzzellen voneinander unterschieden werden. Als Kontrolle

werden PBMC und Milzzellen im Verlauf jeweils auch allein gemessen. Außerdem werden Zytokinkonzentrationen aus allen MLCs mittels ELISA bestimmt.

3.1 Studienpopulation

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag ein Votum der Ethikkommission Tübingen mit der Prüfnummer 308/2004 vom 17.11.2004 zur Einrichtung einer Gewebe- und Blutbank zur Erforschung pathophysiologischer Mechanismen bei Organtransplantation vor.

In die Studie wurden 23 lebertransplantierte Patienten (10 weiblich, 13 männlich) eingeschlossen; darunter 4 Retransplantierte und 4 Patienten, die im Verlauf bis zur Blutentnahme klinisch eine Abstoßung zeigten. Als Kontrolle dienten vier Organspender, denen sowohl Blut als auch Milz entnommen wurde sowie drei gesunde Probanden, die ihr Blut zur Verfügung stellten.

Die äthyltoxische Leberzirrhose (mit konsekutivem HCC) stellt in der Studienpopulation die häufigste Indikation zur Lebertransplantation dar (Tabelle 2). Bei zwei Patienten waren jeweils zwei Erkrankungen ursächlich für die Lebertransplantation. In diese Studie wurden explizit auch Patienten mit viraler Hepatitis eingeschlossen, da anzunehmen ist, dass gerade diese Patientengruppe aufgrund des relativ hohen Rezidivrisikos von einer Reduktion der Immunsuppressiva profitieren könnte.

Tabelle 2
Der Lebertransplantation zu Grunde liegende Erkrankungen des Patientenkollektivs (n=23). Zwei Patienten haben zwei Grunderkrankungen.

Grunderkrankung	Anzahl
Äthyltoxische Leberzirrhose/HCC	11
Virale Hepatitis/HCC	8
Medikamentös-toxisches Leberversagen	2
Autoimmunerkrankungen	2
Sonstige	2

Von allen Organempfängern wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme für diese Studie Blutbild, GOT, GPT, Gesamtbilirubin, immunsuppressive Medikation,

Größe, Gewicht und Alter bestimmt. Die experimentelle Erhebung umfasste die Zytokinkonzentrationen in den einzelnen MLCs sowie die Quantifizierung vitaler und avitaler Target- und Effektorzellen. Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Zellkulturbedingungen.

3.2 Zeitlicher Ablauf

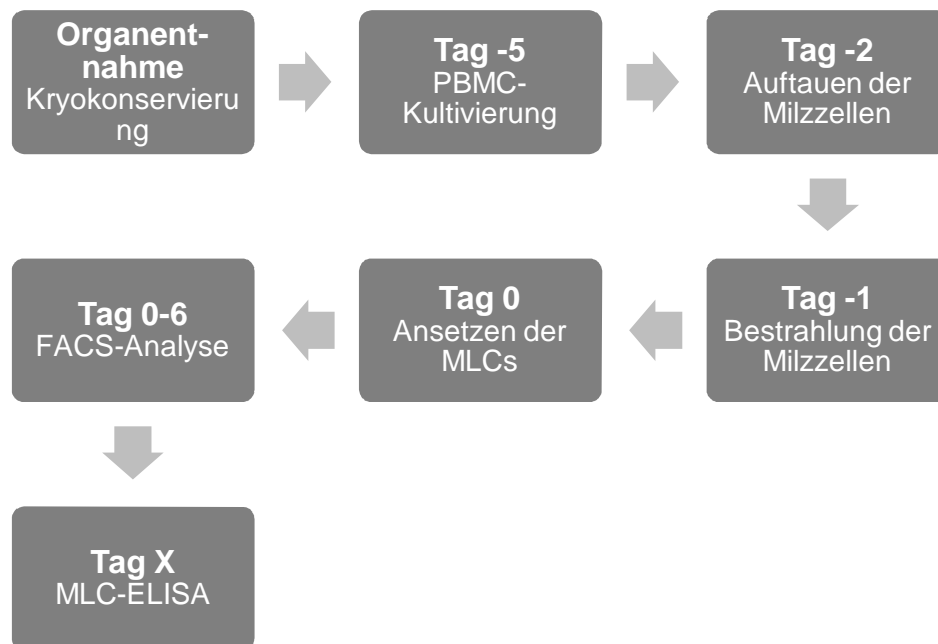


Abbildung 2 Zeitlicher Ablauf des Experiments.

Am Tag der Organentnahme wurden die vitalen Milzzellen kryokonserviert. Fünf Tage vor Beginn der FACS-Messung wurden die PBMC isoliert und kultiviert, zwei Tage vor Beginn der Messreihe wurden die Milzzellen wieder aufgetaut. Am ersten der insgesamt sieben Messtage (Tag 0) wurden die MLCs angesetzt. Der MLC-ELISA konnte zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Am Tag der Organentnahme und Transplantation wurden die Milzzellen möglichst rasch isoliert und kryokonserviert (Abbildung 2). Bis dahin sollten sie in RPMI gekühlt aufbewahrt werden. Fünf Tage vor der ersten Messung, die hier etwa 1,5 Monate bis über acht Jahre nach Transplantation erfolgte, wurden die PBMC aus heparinisiertem Empfängervollblut isoliert und kultiviert. Drei Tage später wurden auch die Milzzellen aufgetaut und am Folgetag bestrahlt. Die MLCs wurden erst kurz vor der ersten FACS-Messung angesetzt. An den sechs Folgetagen wurden jeweils wieder PBMCs und Milzzellen aus allen Ansätzen gemessen und Proben aus den MLCs für den ELISA eingefroren.

3.3 Spender-Milzzellisolierung und Kryokonservierung (Zielzellen)

Im Rahmen der Organentnahme wurde dem Donor ein Stück Milz entnommen, das bis zur Kryokonservierung in RPMI gekühlt aufbewahrt wurde.

Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz mit der Schere zerkleinert, mit dem Boden des Erlenmeyerkolbens durch das Sieb gedrückt und mit RPMI gespült, die Zellsuspension in 50 ml Falcon Tubes überführt und 10 Minuten bei 800 · g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in Medium resuspendiert und mit einer Pipette aufgerührt. Die Klumpen wurden verworfen. Nochmals wurde die Suspension 10 Minuten bei 600 · g und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Lösung A aus 80% RPMI und 20% FCS sowie die Lösung B aus 60% RPMI, 20% FCS und 20% DMSO hergestellt und gekühlt. Die zentrifugierte Zellsuspension wurde dekantiert, das Pellet in RPMI resuspendiert und 10 Minuten bei 200 · g und 4 °C zentrifugiert, sodass die Thrombozyten in den Überstand übergehen. Dieser Überstand wurde abgesaugt und das Sediment auf Eis mit Lösung A auf 5 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es sollten nicht mehr als 20% der Zellen tot sein, die Sollzellzahl liegt bei 10^7 - 10^8 pro Tube. In Abhängigkeit von der Zellzahl wurde die Suspension mit Lösung A bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt und anschließend die gleiche Menge Lösung B zugegeben und gemischt. Auf Eiswasser wurden je 2 ml Zellsuspension in einen Kryotube pipettiert, eingefroren und bis zur Verwendung bei ca. -174 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4 Auftauen der Milzzellen

Die Milzzellen wurden zwei Tage vor dem ersten Messtag aufgetaut, um sie noch zwei Tage im Brutschrank zu inkubieren und zu bestrahlen. Zuerst wurde das Kulturmedium hergestellt aus:

500 ml RPMI

5 ml Gentamycin

5,5 ml Glutamin

5,5 ml Hepes-Pufferlösung

50 ml FCS

Jeweils 20 ml Medium und ein Tube Milzzellen aus dem Stickstofftank wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die gefrorenen Zellen müssen sich aus dem Tube lösen können, sollten aber nicht vollständig aufgetaut sein. Wenn mehrere Tubes aufgetaut werden, ist es sinnvoll, die Zellen entsprechend in mehrere Falcon-Tubes aufzuteilen und nicht in eine Kulturflasche zu geben um ein eventuelles Verklumpen zu vermeiden.

Die Milzzellen wurden ins Medium überführt und 10 Minuten bei 750 · g zentrifugiert. Das Pellet wurde noch zweimal gewaschen und dabei wie vorher zentrifugiert. Die Milzzellen wurden auf 10^6 · 10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt und in eine 24 well-Platte ausgesät, dann für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Milzzellen mit 3 mM DIO_{18 (3)} markiert. DIO_{18 (3)} fluoresziert grün und wird fast irreversibel in die Zellmembranen sowohl aktiver als auch ruhender Zellen eingebaut. Für 1 x 10^6 Zellen / ml wurden 6 µmol DIO zugegeben, entsprechend 2 ml 3mM DIO. Die Zellen wurden 45 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und zwischendurch etwa alle fünf Minuten leicht geschüttelt. Danach wurden die Zellen in Falcon Tubes pipettiert und zweimal mit PBS und 3% FCS gewaschen, dazu mit 200 · g für 10 Minuten zentrifugieren. Im Anschluss wurden die Zellen ausgezählt, in RPMI auf 10^6 · 10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt und im Brutschrank weitere 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Bestrahlung der Targetzellen für 13 Minuten bei 30 Gray.

3.5 PBMC-Kultivierung aus Blut (Effektorzellen)

Die Effektorzellen (PBMC) wurden 1,5 Monate bis acht Jahre nach Transplantation aus Vollblut von Leberempfängern, Organspendern und gesunden Probanden gewonnen.

PBMC können am einfachsten mittels Dichtegradientenzentrifugation über eine fertige Dichtegradientenlösung aus Vollblut isoliert werden. Nach der Zentrifugation befand sich im Sediment die Erythrozyten und Granulozyten, darüber die Trennlösung, dann die milchige Interphase, die die mononukleären Zellen, aber auch basophile Granulozyten und Thrombozyten enthielt, und in der obersten Schicht das Serum.

Zuerst wurde wieder ein Kulturmedium hergestellt aus:

500 ml RPMI

5 ml Gentamycin

5,5 ml Glutamin

5,5 ml HEPES-Buffer

50 ml FCS

0,132 ml ConA

Vier Röhrchen frisches heparinisiertes Vollblut wurden im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und dann im Verhältnis 2:1 (Blut und PBS : Biocoll) auf Biocolltrennlösung geschichtet. Dies sollte vorsichtig geschehen, um den Kontakt zwischen den zu separierenden Zellen und der zytotoxischen Trennlösung möglichst gering zu halten. Die Suspension wurde 25 Minuten bei $1100 \cdot g$ ohne Bremse zentrifugiert, die Interphase unter vorsichtigen kreisförmigen Bewegungen mit einer 5 ml-Pipette abgenommen, in einen Falcon Tube gegeben und mit PBS aufgefüllt. Im Anschluss wurde die ganze Suspension noch einmal für 10 Minuten bei $300 \cdot g$ ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet ins Kulturmedium aufgenommen.

Die Zellen wurden ausgezählt, auf 10^6 - 10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt, in eine 24 well-Platte ausgesät und für fünf Tage bei $37^\circ C$ und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert, um einen immunsuppressiven Effekt in der MLC zu vermeiden.

3.6 Gemischte Lymphozytenkultur

(Mixed Lymphocyte Culture MLC)

Die MLCs wurden im Verhältnis 1:1 aus 100 µl Effektorzell- und 100 µl Zielzellsuspension gemischt, in eine 96-well-Platte ausgesät und für ein bis sechs Tage kultiviert. Die geernteten Zellen wurden kurz vor der FACS-Analyse mit 2,5 mg Propidiumiodid (PI) pro Milliliter FACS-Analysat gelabelt. PI färbt tote Zellen, kann jedoch nicht durch die intakte Membran vitaler Zellen ins Zellinnere gelangen.

Für den ELISA wurde den MLCs Zellsuspension entnommen, eingefroren und später weiteruntersucht.

Folgende MLCs wurden angesetzt:

1) MLC-t: Empfänger-PBMC und Milzzellen des zugehörigen Organspenders; entspricht dem in-vitro-Modell des Immunsystems des transplantierten Patienten. Es handelt sich um einen donorspezifischen Zytotoxizitätsassay, der je nach Toleranzstatus unterschiedlich ausfällt.

2) MLC-3: Empfänger-PBMC und fremde Milzzellen; entspricht dem in-vitro-Modell einer Abstoßung.

3) PBMC: nur PBMCs;

Die Messung soll zeigen, wie lange PBMCs ohne den Einfluss anderer Zellen unter den vorliegenden Kulturbedingungen überhaupt in-vitro überleben.

4) Spleen: nur Milzzellen;

zeigt, wie lange Milzzellen unter den experimentellen Bedingungen überleben.

5) MLC-a: Spender-PBMC und Spender-Milzzellen;

entspricht dem in-vitro Modell genetisch gleicher Zellen, die also sicher tolerant sind.

3.7 FACS-Analyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Zellen anhand Größe, Granularität und

Farbstoff mit einem Laser angeregt werden. Anhand des emittierten Lichts unterschiedlicher Wellenlängen können Zellen sortiert und quantitativ gemessen werden. Mittels spezieller Farbstoffe können beispielsweise auch nur Zellen mit bestimmten Oberflächenantigenen markiert und messbar gemacht werden.

In diesem Fall wurde das *LIVE/DEAD® Cell-Mediated Cytotoxicity Kit* angewandt. Die Zellen wurden wie vom Hersteller angegeben mit PI und DIO gefärbt. DIO lagert sich in die Zellmembran ein und fluoresziert grün in FL-1 (Emissionsmaximum 520 nm) (Abbildung 3). PI fluoresziert rot in FL-3 (> 425 nm). Es interkaliert in die DNA wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist, d.h. es färbt den Zellkern toter Zellen. Die Laserexzitation erfolgte mit 488 nm. Die Zellen können dann wie in Abbildung 3 dargestellt identifiziert werden.

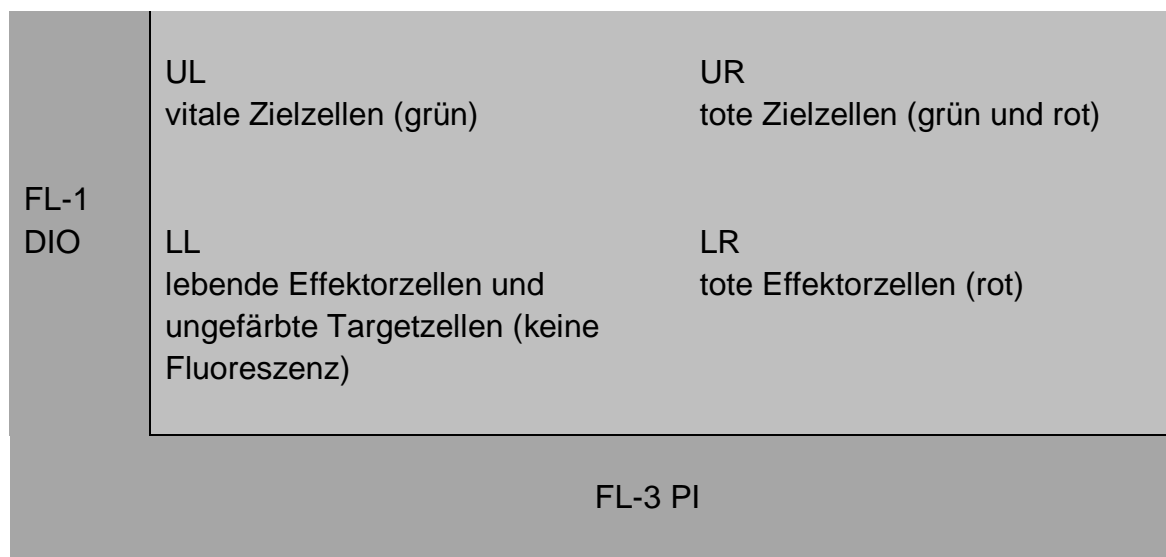


Abbildung 3

Schema einer FACS-Messung nach DIO- und PI-Färbung.

Im linken oberen Quadranten siedeln sich vitale Zielzellen an, im rechten oberen Quadranten avitale Zielzellen, im linken unteren Quadranten lebende Effektorzellen und im rechten unteren Quadranten tote Effektorzellen.

Pro FACS-Messung wurden 20.000 Zellen gemessen und mittels der Software CellQuest analysiert. In Einzelfällen wurde die Messung aufgrund von Materialmangel vorzeitig beendet.

3.8 Interleukin-ELISA

Mit dem *BMS810FF human Th1/Th2 11plex Kit* wurden aus den MLCs IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α und TNF- β quantitativ bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software *SAS JMP 10.0.2*. Außerdem wurden zur Erstellung der Arbeit *Microsoft Word* und *EndNote X5* verwendet. In den Grafiken sowie im Text werden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Die Mittelwerte wurden mit Students t-Test bzw. Tukey-Kramer-HSD verglichen. Ein P-Wert < 0,05 wird als signifikant angesehen.

Dem Grenzwert für eine Erhöhung der Leberwerte lagen die derzeit gültigen Referenzwerte des Zentrallabors der Universitätsklinik Tübingen zugrunde (GOT bis 35 U/l, GPT bis 35 U/l, Gesamtbilirubin bis 1,1 mg/dl).

Zum Zeitpunkt 0 haben alle Zytokinkonzentrationen in den MLCs den Wert 0 pg/ml, weil das Zellkulturmedium keine Zytokine enthält.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluation des Tests

4.1.1 Effektor- und Ziellzellzahlen

Bei der FACS-Analyse wurden in den Kontrollen mit reinen Kulturen aus PBMC- und Milzzellen im Mittel immer mehr als 99,5 % der Gesamtzellen richtig als PBMC bzw. Milzzellen gemessen und zeigten unter den Kulturbedingungen innerhalb der sechs Messtage ein gutes Überleben.

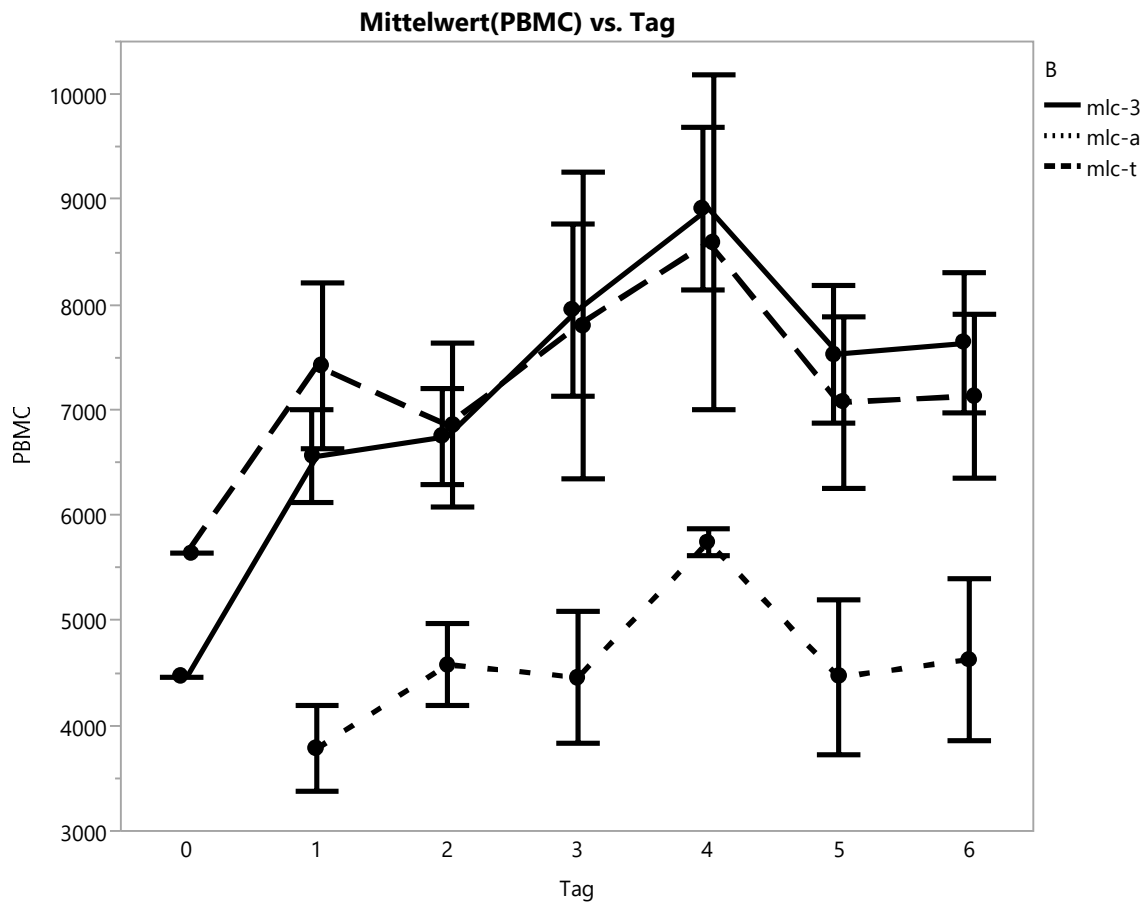


Abbildung 4
Verlauf der Mittelwerte und SEM der absoluten PBMC-Zahl in MLC-3, MLC-a und MLC-t.

Bei der FACS-Messung der absoluten PBMC-Zahlen in den drei gemischten Leukozytenkulturen (Abbildung 4) ergab sich eine niedrigere PBMC-Zahl in der MLC-a als in der MLC-t und der MLC-3 bei grundsätzlich sehr ähnlichem Verlauf mit einem leichten Anstieg am vierten Messtag. Die autologen Kulturen wiesen im Mittel Werte von 3790-5751 auf, während sich die PBMC-Zahlen in den anderen beiden Kulturen im Durchschnitt zwischen 6569 und 8920 bewegten. Signifikant war der Unterschied in der MLC-a gegenüber der MLC-t und MLC-3 bereits an Messtag 1 (MLC-a 3797, SEM \pm 410; MLC-t 7425, SEM \pm 788; MLC-3 6569, SEM \pm 439).

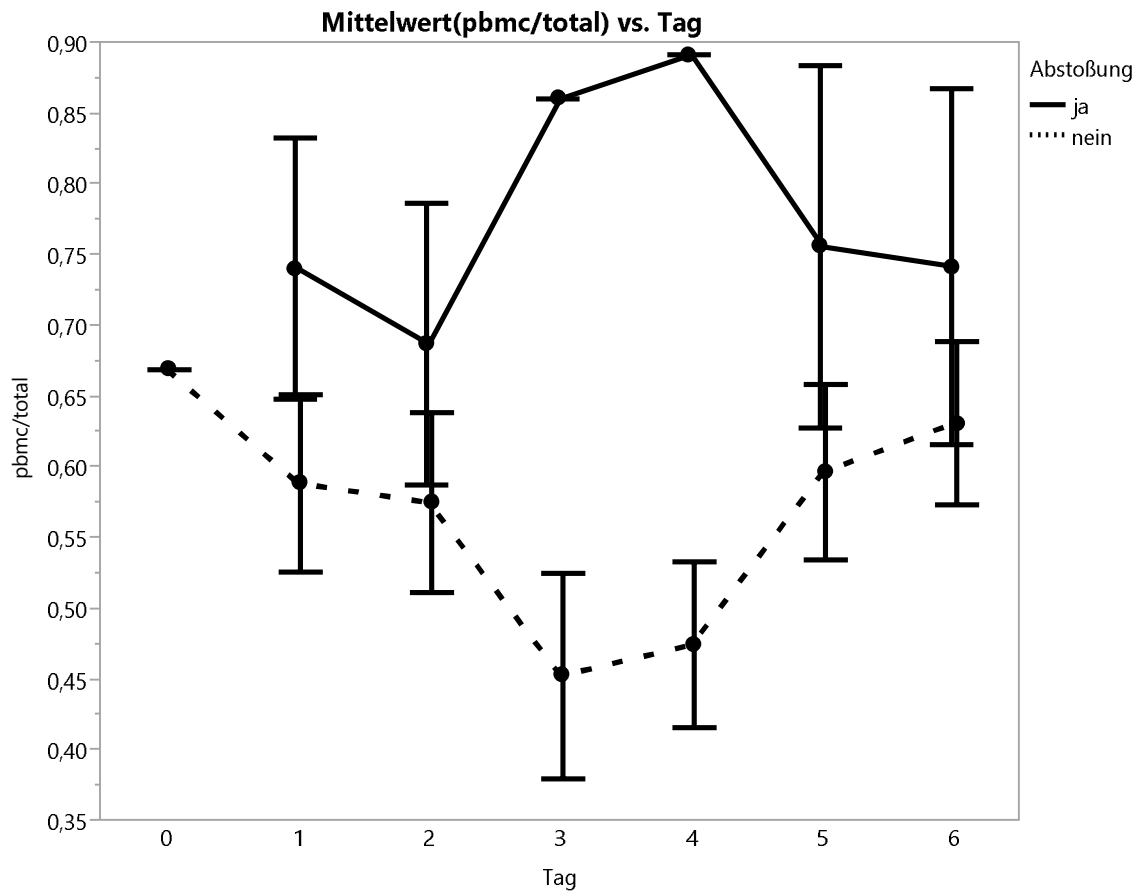


Abbildung 5
Mittelwerte und SEM des PBMC-Anteils in der MLC-t an der Gesamtzellzahl bei Patienten mit und ohne stattgehabte Abstoßung.

Passend zu den niedrigen PBMC-Zahlen in der autologen Kultur zeigte sich bei der weiteren Auswertung für den Patienten ohne stattgehabte Abstoßung am vierten Messtag ein signifikant niedrigerer PBMC-Anteil (Abbildung 5) von 47,4 % in der MLC-t gegenüber den Patienten mit Abstoßung von durchschnittlich 89,1 % (vgl. Abbildung 18 Seite 42 . absolute PBMC-Zahlen).

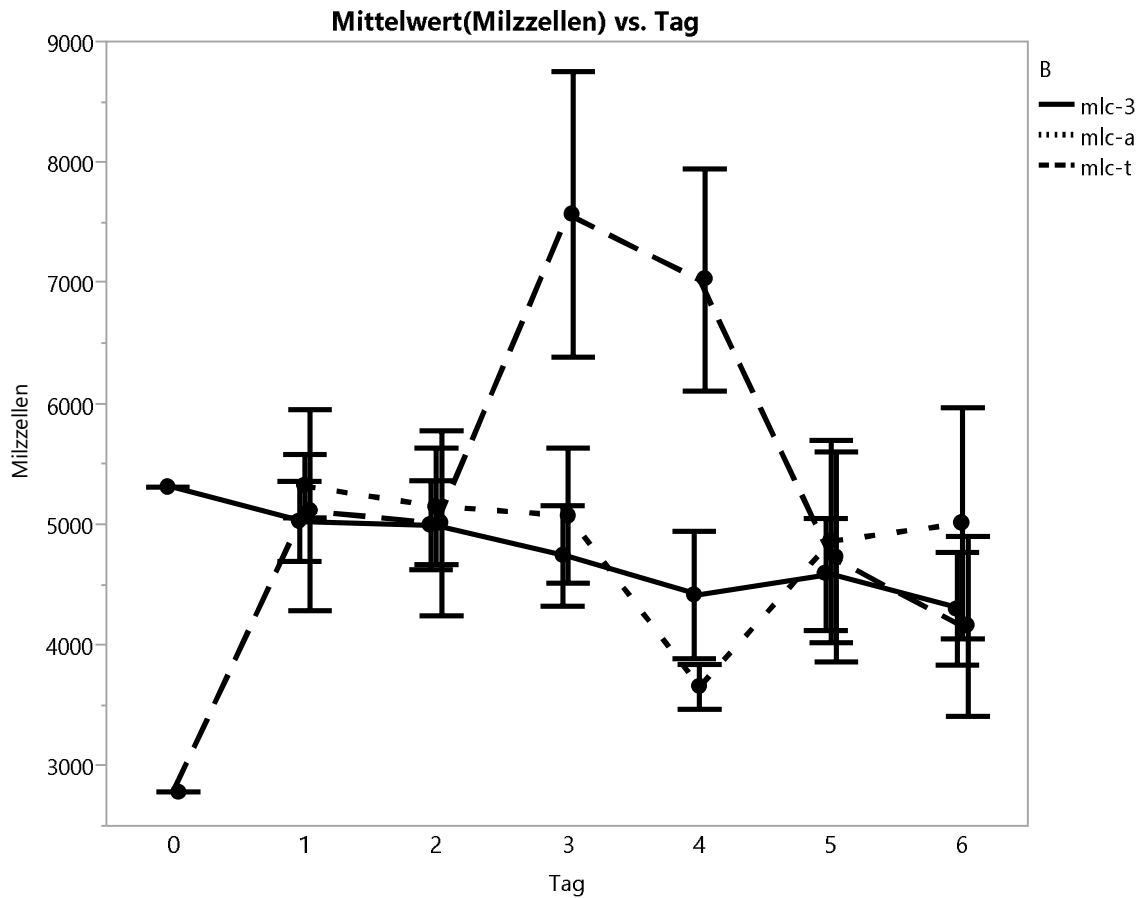


Abbildung 6
Mittelwerte und SEM der absoluten Milzzellzahlen in MLC-3, MLC-a und MLC-t.

Für die FACS-Analyse der Milzzellen (Abbildung 6) zeigte sich, dass die Milzzellzahlen in der MLC-3 langsam absinken und in der MLC-a am vierten Messtag konträr zu den PBMC-Zahlen ein relatives Minimum erreicht wird. In der MLC-t wird dagegen interessanterweise am dritten und vierten Messtag ein relatives Maximum erreicht, dass sich an Messtag 3 signifikant von dem Ergebnis der MLC-3 abhebt (MLC-t 7572, SEM \pm 1184; MLC-3 4742, SEM \pm 417), an Messtag 4 sogar von der MLC-a und der MLC-3 (MLC-t 7030, SEM \pm 922; MLC-3 4421, SEM \pm 529; MLC-a 3658, SEM \pm 186).

4.1.2 Zytokinprofil

Die MLC-3 (gegen einen völlig fremden Organismus) wird in den Diagrammen als durchgehende Linie dargestellt, die MLC-a (gegen den eigenen Organismus) gepunktet und die MLC-t (gegen den Donor) gestrichelt.

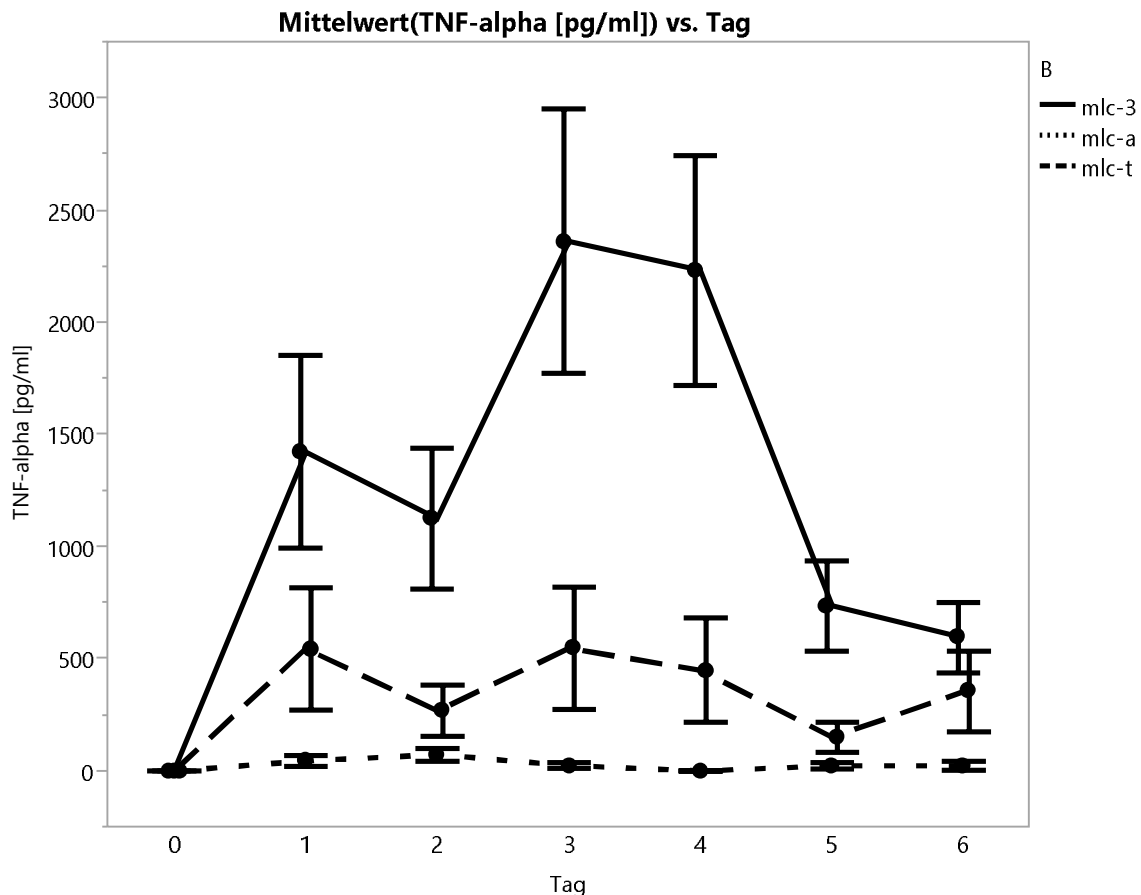


Abbildung 7
Mittelwerte und SEM der TNF- α -Konzentration in MLC-3, MLC-a und MLC-t.

In der MLC-a wurde fast gar kein TNF- α gebildet (Abbildung 7), der Mittelwert lag in dieser Kultur bei maximal 74 pg/ml SEM \pm 29 an Tag 2. Die Mittelwerte der donorspezifischen MLC-t lagen an allen 6 Messtagen zwischen denen der MLC-a und MLC-3. Vor allem in der MLC-3 wurden deutlich höhere Konzentrationen von TNF- α gemessen. Signifikant war der Konzentrationsunterschied an Tag 3 zwischen MLC-3 und MLC-a. Zur MLC-t war der Vergleich jeweils nicht signifikant. In der MLC-3 wurde (wie auch bei vielen anderen Messwerten) an Tag 3 und 4 ein Maximum erreicht (Mittelwert

2364 pg/ml, SEM \pm 590 bzw. 2234 pg/ml, SEM \pm 514). Danach sank die TNF- -Konzentration unter das Ausgangsniveau von 1100-1400pg/ml auf 600-700pg/ml ab.

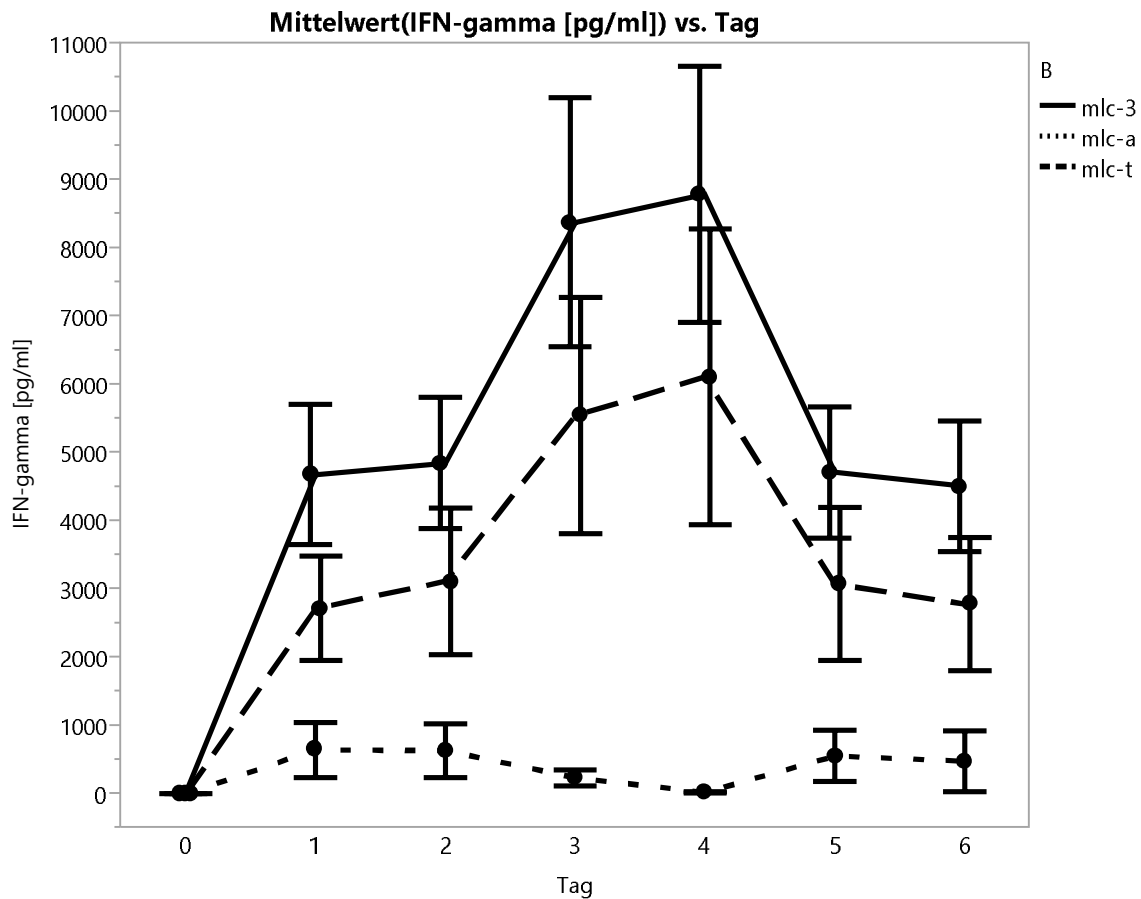


Abbildung 8
Mittelwerte und SEM der IFN- -Konzentration in MLC-3, MLC-a und MLC-t.

Vergleichbar mit der TNF- -Messung wurde IFN- in der MLC-a nur wenig und in der MLC-3 deutlich gebildet (Abbildung 8). Die MLC-t-Kurve verlief für die IFN- -Konzentrationen aber eher wie die MLC-3-Kurve, d.h. auf etwa 2000 pg/ml niedrigerem Niveau als die MLC-3, aber auch mit Maximalwerten an Tag 3 (Mittelwert 5544 pg/ml, SEM \pm 1733) und Tag 4 (Mittelwert 6112 pg/ml, SEM \pm 2166). Im Gegensatz dazu bildete die TNF- -Konzentration in der MLC-t kein Maximum aus.

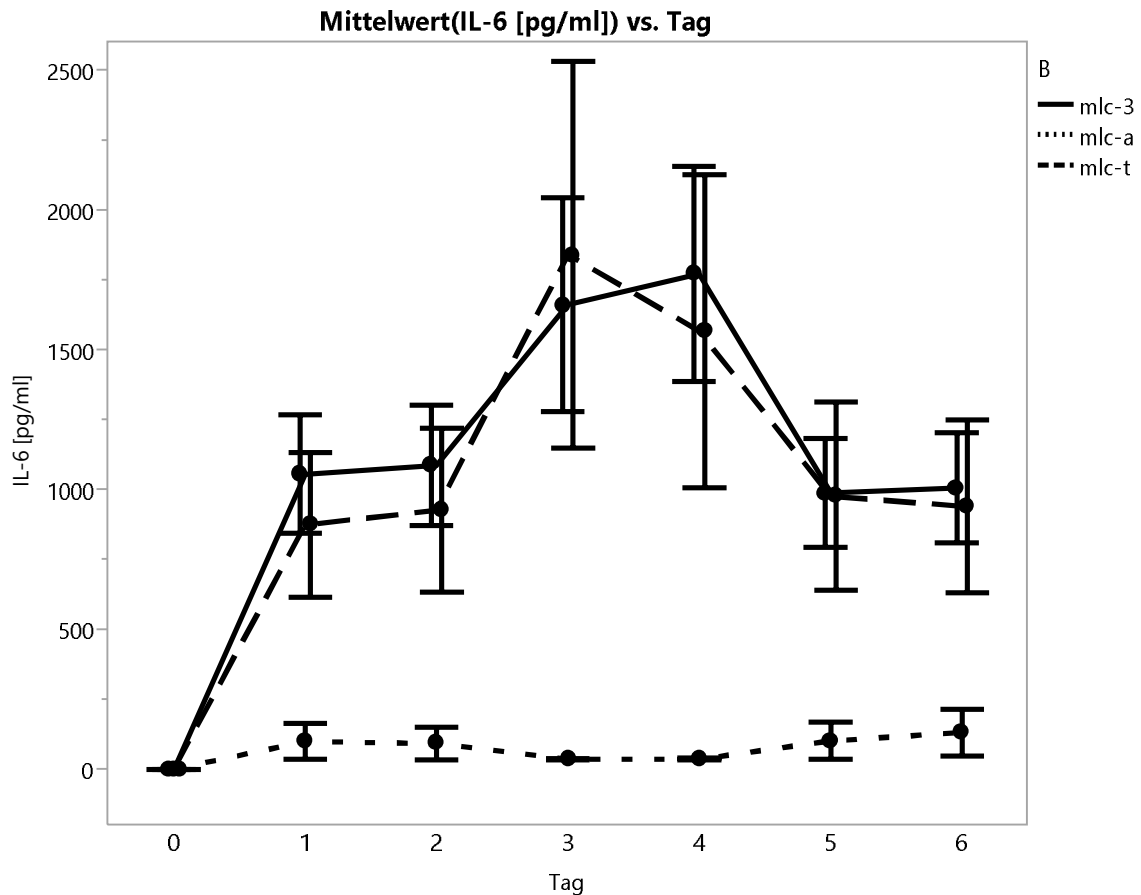


Abbildung 9
Mittelwerte und SEM der IL-6-Konzentration in MLC-3, MLC-t und MLC-a.

IL-6 wurde etwa in gleichem Maße in der MLC-t und der MLC-3 gebildet, während in der MLC-a nur geringe Konzentrationen mit einem maximalen Mittelwert von 132 pg/ml SEM \pm 83 an Tag 6 gemessen wurden (Abbildung 9). MLC-t und MLC-3 wiesen wieder einen typischen Verlauf mit Maximalwerten an Tag 3 und 4 auf. Signifikante Unterschiede wurden jedoch nicht ermittelt. Die gemessenen IL-5- und TNF- β -Konzentrationen waren mit der IL-6-Messung vergleichbar, brachten jedoch bis auf eine Ausnahme auch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede: die Zellen der MLC-a bildeten an Tag 3 signifikant weniger TNF- β als die Zellen in der MLC-3.

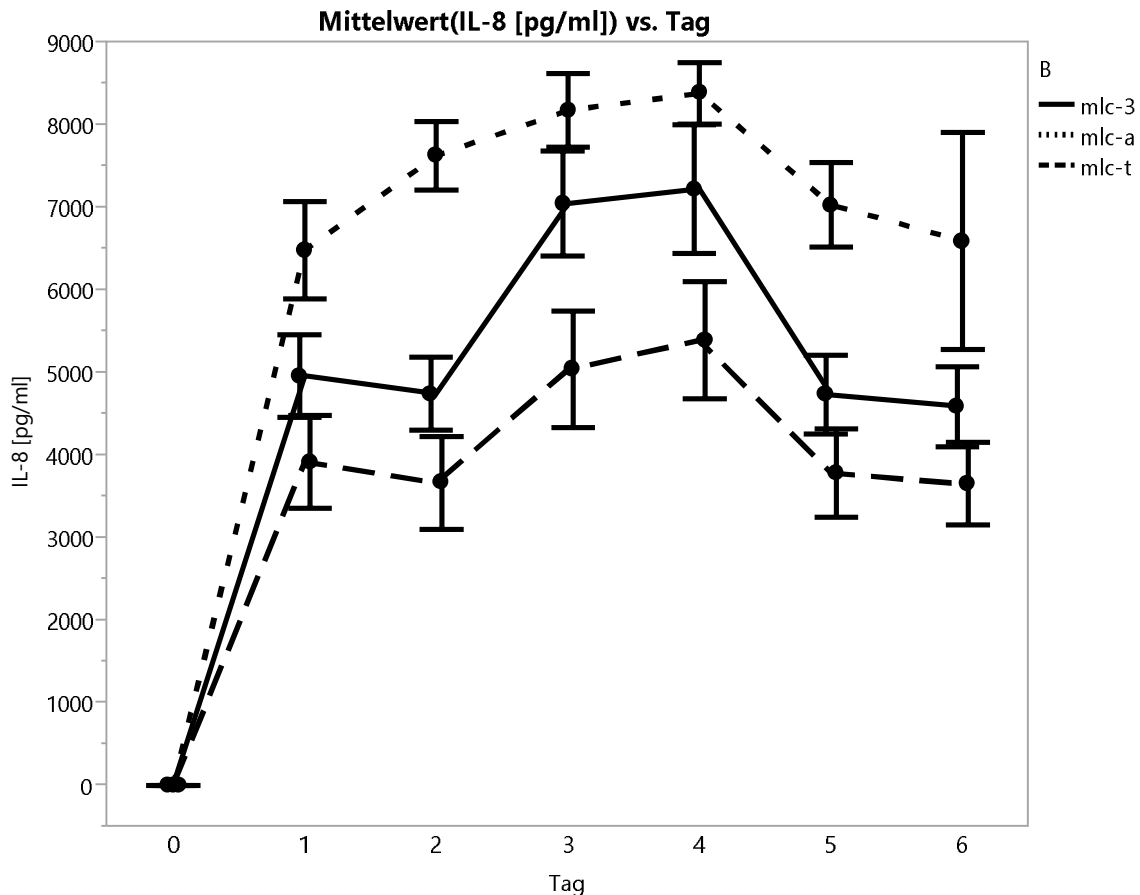


Abbildung 10
Mittelwerte und SEM der IL-8-Konzentrationen in MLC-a, MLC-3 und MLC-t.

IL-8 zeigte im Gegensatz zu den bisher gezeigten Ergebnissen die höchste Konzentration in der MLC-a und nicht in MLC-3 oder MLC-t (Abbildung 10). Die Mittelwerte stiegen in den drei MLCs jeweils bis einschließlich Tag 4 (Mittelwert 8381 pg/ml, SEM \pm 375) stark an und sanken an den letzten beiden Tagen wieder leicht ab. An Tag 2 lag die Konzentration in der MLC-a signifikant über der in der MLC-3 und der MLC-t. An Tag 3 und 5 wurde signifikant mehr IL-8 in der MLC-a als in der MLC-t gemessen, der Unterschied zur MLC-3 war hier nicht signifikant.

Die MLC-3 wies die zweithöchsten Werte auf und bildete wie auch die MLC-t ein Maximum am dritten und vierten Tag.

Interessanterweise fand sich die niedrigste IL-8-Konzentration in der MLC-t, die

sonst immer Konzentration bzw. Zellzahlen im Bereich zwischen MLC-a und MLC-3 lieferte.

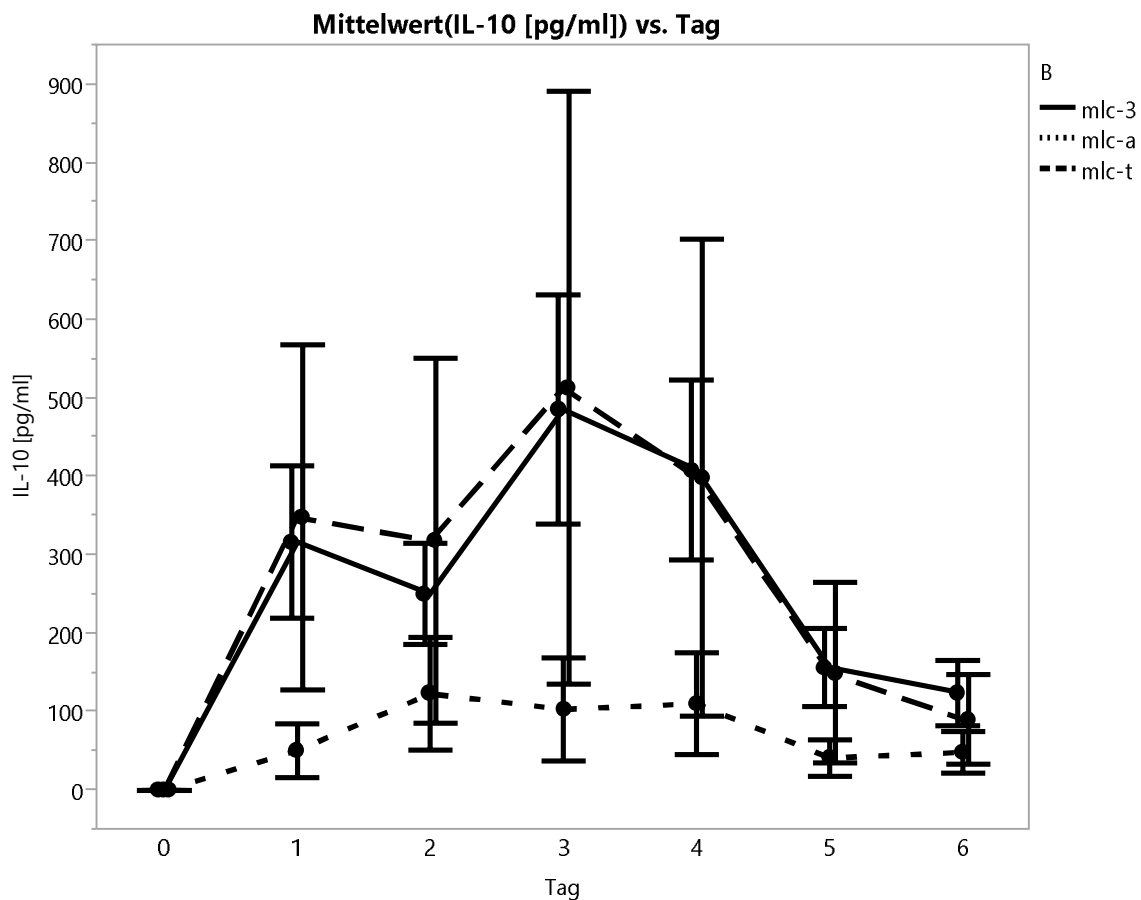


Abbildung 11
Verlauf der Mittelwerte von Interleukin 10 in den Kulturen MLC-3, MLC-a und MLC-t für alle Patienten.

Innerhalb der gesamten Studienpopulation wurde in der MLC-a, d.h. in der autologen Kultur, konstant wenig IL-10 gemessen (Maximum 123 pg/ml, SEM \pm 72) (Abbildung 11). Die Mittelwerte von IL-10 in MLC-3 und MLC-t zeigten für das Patientenkollektiv einen ähnlichen und insgesamt höheren Verlauf als in der MLC-a. Sie bildeten beide am dritten Tag ein Maximum aus (MLC-3 486 pg/ml, SEM \pm 146; MLC-t 513 pg/ml, SEM \pm 378). Vor allem die MLC-t wies aber sehr große Standardfehler auf, sodass im Vergleich aller MLC-Gruppen untereinander keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der IL-10-Konzentration gefunden wurden.

Unter Ausschluss der zwei Patienten 1 und 19 mit extremen IL-10-Werten änderte sich der Verlauf (Abbildung 12).

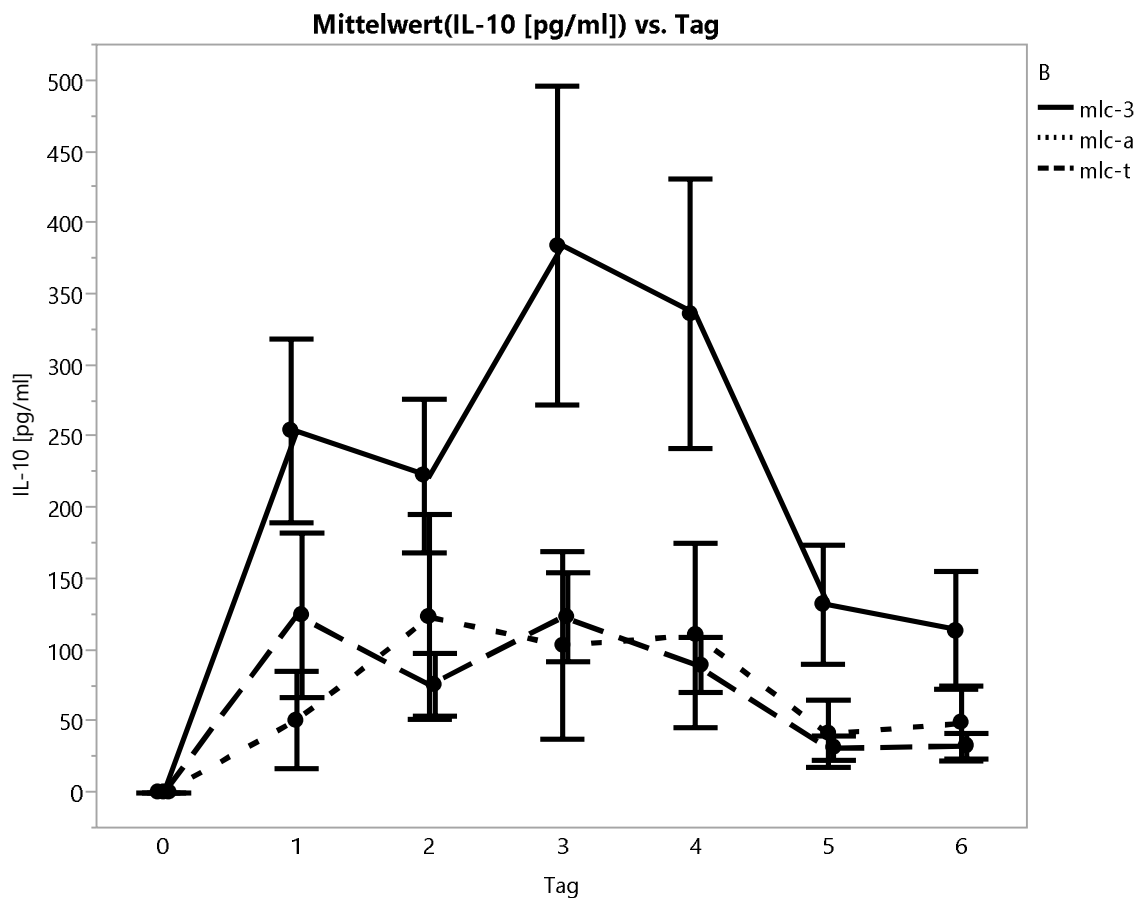


Abbildung 12
Mittelwerte von IL-10 in MLC-3, MLC-a und MLC-t unter Ausschluss der Patienten 1 und 19.

Die Kurve der MLC-t glich sich unter Ausschluss der Patienten 1 und 19 der der MLC-a an (Maximum der MLC-t 125, SEM \pm 58; Maximum der MLC-a 123, SEM \pm 72). Außerdem wurde der Standardfehler in der MLC-t sehr viel kleiner (vgl. für alle Patienten maximal SEM \pm 378 und unter Ausschluss der beiden Patienten maximal SEM \pm 58).

IL-2 wurde am meisten in der MLC-3 gebildet, in der MLC-a fast gar nicht. Die gemessenen Konzentrationen in der MLC-t lagen im Mittel an allen Tagen dazwischen. Die Mittelwerte der IL-2 Konzentrationen unterschieden sich in den

drei MLC-Typen nicht signifikant. Außer in der MLC-a variierte die Interleukinkonzentration intra- und interindividuell sehr stark.

Für IL-12p70 gab es keine deutlichen Messwerte. IL-4 wurde insgesamt auch nur wenig in den Kulturen gebildet. Am höchsten war die Konzentration bei sehr großem Standardfehler am ehesten in der MLC-3. IL-1 β wies die höchsten Werte in der MLC-3 und die zweithöchsten Werte in der MLC-t auf. Die Konzentration sank über die sechs Messtage in allen drei Kulturarten etwas ab. Signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar.

4.2 Abstoßungsdiagnostik

4.2.1 Transaminasenaktivität im Serum

Im Folgenden zeigen die durchgängigen Kurven den Mittelwertverlauf bei Patienten mit erhöhter Transaminasenaktivität und die gepunkteten Kurven den Verlauf ohne Erhöhung der GPT oder GOT. Als Grenzwert für eine Erhöhung wurde der Referenzbereich des Zentrallabors der Universitätsklinik Tübingen festgelegt.

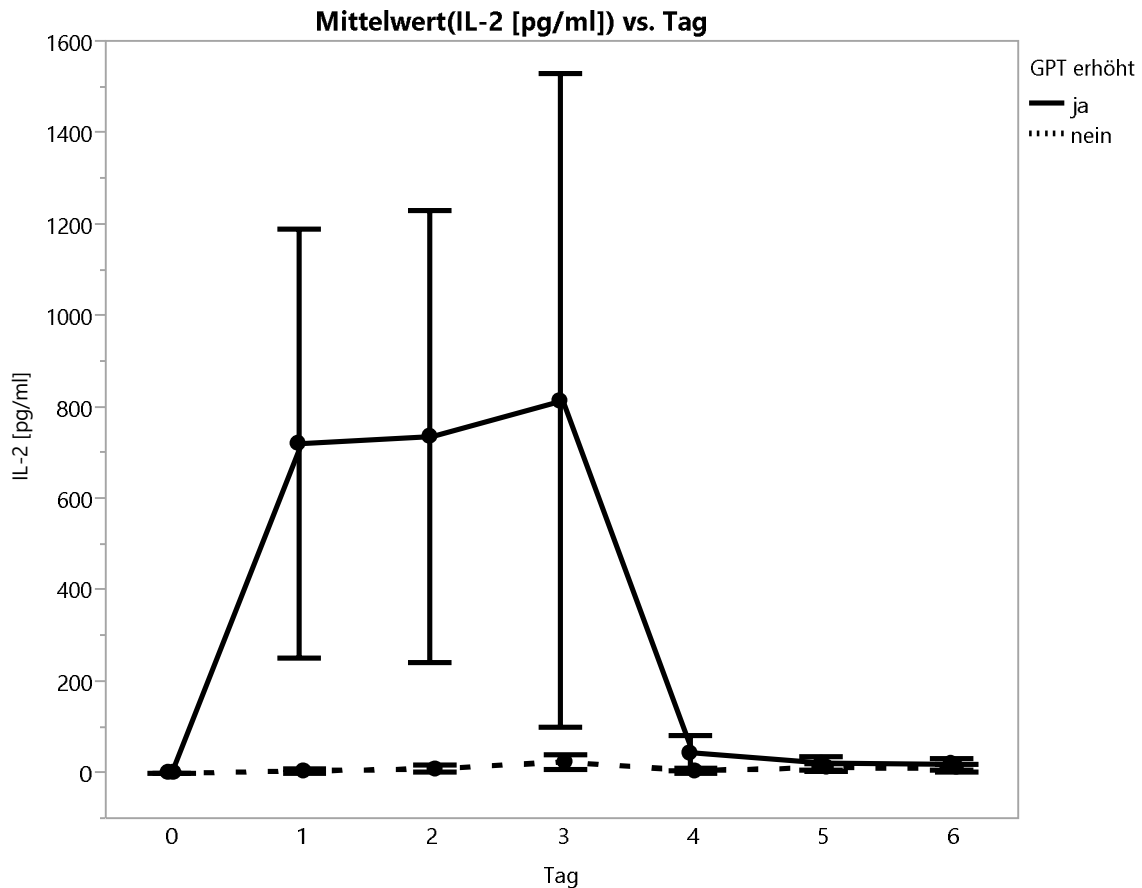


Abbildung 13

Mittelwerte von IL-2 in der MLC-t für Patienten mit GPT-Erhöhung und für Patienten ohne GPT-Erhöhung.

In der MLC-t zeigten Patienten mit erhöhter GPT-Aktivität im Serum bis zum dritten Messtag eine IL-2-Produktion auf die Spendermilzzellen (Abbildung 13), während die Patientengruppe mit normwertiger GPT in vitro fast kein IL-2 bildete. Am 4. Tag war auch in der MLC-t der Patienten mit GPT-Erhöhung kaum noch IL-2 nachweisbar. Insbesondere an den Tagen 1-3 wurden im Mittel in der MLC-t Werte von bis zu 700-800pg/ml gemessen, jedoch waren auch die Standardfehler sehr hoch. An den Tagen 4-6 wurde wesentlich weniger IL-2 in der MLC-t gebildet. Im Gegensatz dazu konnte bei den Patienten mit normwertiger GPT fast kein IL-2 in der Kultur gemessen werden (größter Mittelwert 25 pg/ml, SEM \pm 16).

Signifikante Unterschiede bezüglich der IL-2-Konzentration in den MLC-t zwischen den beiden Patientengruppen konnten aber nicht nachgewiesen

werden. Ähnlich wie für die IL-2-Konzentration zeigte sich der Verlauf auch für IL-10 in den MLC-t (nicht signifikant).

Vergleicht man die MLC-t und MLC-3 von Patienten mit und ohne GPT-Erhöhung (Abbildung 14), so fällt auf, dass bei Patienten mit erhöhter GPT-Aktivität als laborchemischer Hinweis für einen Transplantatdysfunktion und im weiteren Sinne für eine Abstoßung, sowohl in der MLC-3 als auch in der MLC-t IL-2 Konzentrationen gemessen wurden, die deutlich, wenn auch nicht signifikant über den Konzentrationen in der MLC-t der Patienten ohne GPT-Erhöhung lagen. Die Standardfehler waren hier sehr hoch. In der MLC-t ohne GPT-Erhöhung wurde fast kein IL-2 gebildet, der maximale Mittelwert der IL-2-Konzentration wurde an Tag 3 mit 25 pg/ml, SEM \pm 16 erreicht (vgl. z.B. in der zugehörigen MLC-3 813 pg/ml, SEM \pm 441).

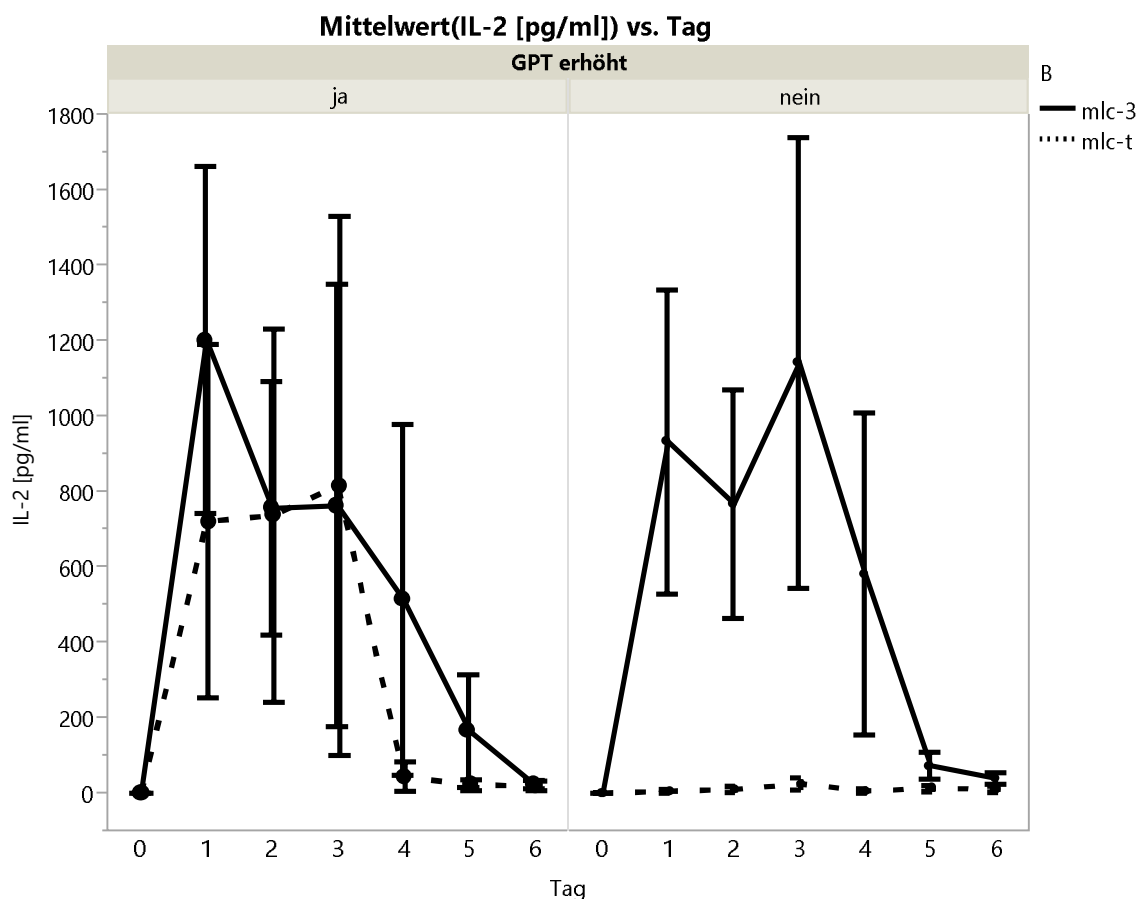


Abbildung 14
Verlauf der Mittelwerte der IL-2-Konzentration in der MLC-t und der MLC-3 bei Patienten mit und ohne GPT-Erhöhung.

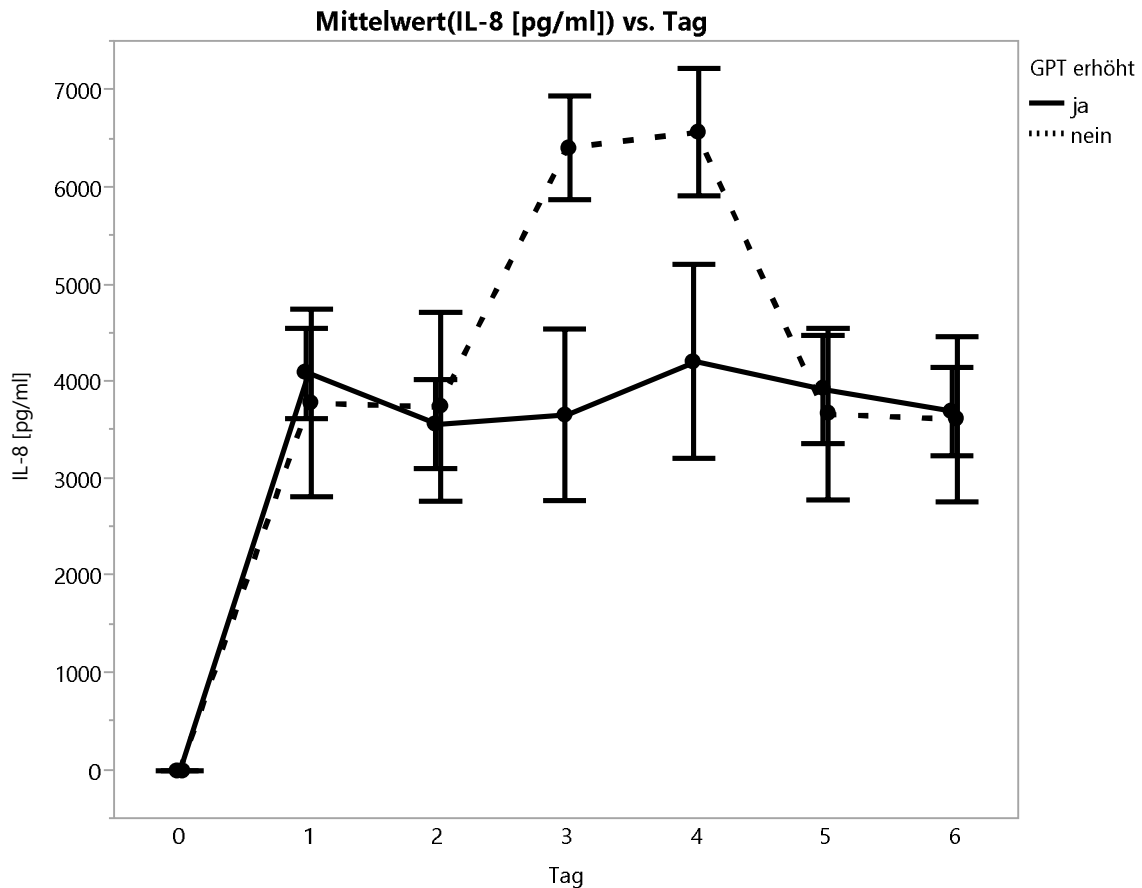


Abbildung 15
Verlauf der Mittelwerte der IL-8-Konzentration in der MLC-t bei Patienten mit GPT-Erhöhung und ohne GPT-Erhöhung.

Die IL-8-Konzentration bewegte sich bei Patienten mit erhöhter GPT durchschnittlich in einem Bereich zwischen 3565 und 4210 pg/ml (SEM \pm 455 bzw. SEM \pm 1000, Abbildung 15). Es konnte kein eindeutiges Maximum ausgemacht werden. Die Patientengruppe ohne GPT-Erhöhung dagegen zeigte initial ähnliche Werte, hatte jedoch einen deutlichen IL-8-Anstieg an Tag 3 und 4. Das Maximum wurde an Tag 4 mit einem Mittelwert von 6568 pg/ml SEM \pm 656 erreicht, ein signifikanter Unterschied der IL-8-Konzentrationen in den beiden Patientenkollektiven wurde an Tag 3 gezeigt. An Tag 5 und 6 wurden wieder ähnliche Konzentrationen bei beiden Gruppen gemessen.

IFN- γ hatte bei beiden Gruppen ein Maximum am vierten Tag (GPT erhöht: 8519 pg/ml, SEM \pm 4008; GPT nicht erhöht: 3705 pg/ml, SEM \pm 1402). In der Gruppe der Patienten mit GPT-Erhöhung wurden durchschnittlich auch 2100-4800 pg/ml IFN- γ mehr verzeichnet als in der Patientengruppe ohne GPT-Erhöhung. Signifikante Unterschiede konnten dennoch nicht gezeigt werden. Ganz ähnliche Tendenzen zeigten die IL-5- und die TNF- β -Messung, jedoch mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen. IL-6 und IL-1 β wiesen keine Unterschiede in den beiden Gruppen auf, IL-4 wurde fast gar nicht gebildet. Patienten mit GPT-Erhöhung bildeten durchschnittlich etwas mehr TNF- α , haben aber sehr hohe Standardfehler.

Insgesamt war IL-8 an Tag 3 bei Patienten mit normwertiger GPT signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit einer GPT > 35 U/l. Andere Messwerte waren für diese Patientengruppierung nicht signifikant unterschiedlich und wiesen in der Regel hohe Standardfehler auf.

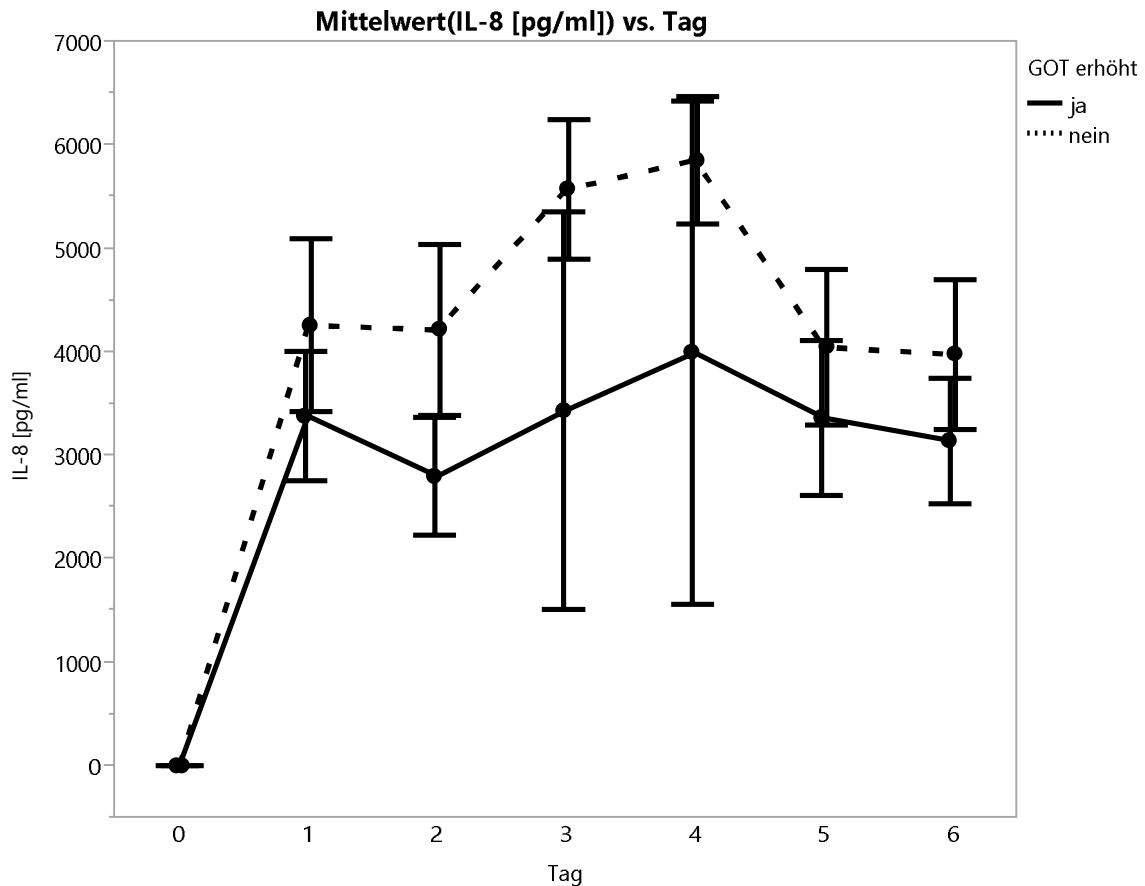


Abbildung 16

Mittelwerte und SEM der IL-8-Konzentrationen in den MLC-t der Patienten mit und ohne GOT-Erhöhung.

Auch in der MLC-t der Patienten mit normwertiger GOT-Aktivität im Serum wurden im Mittel höhere IL-8-Konzentrationen gemessen als in der MLC-t der Patienten mit GOT-Erhöhung (normwertige GOT: 5854 pg/ml, SEM \pm 613 an Tag 4; GOT erhöht: 3994 pg/ml, SEM \pm 2430 an Tag 4, Abbildung 16). Die Unterschiede waren bei sehr hohen Standardfehlern für die MLC-t der Patienten mit GOT-Erhöhung nicht signifikant.

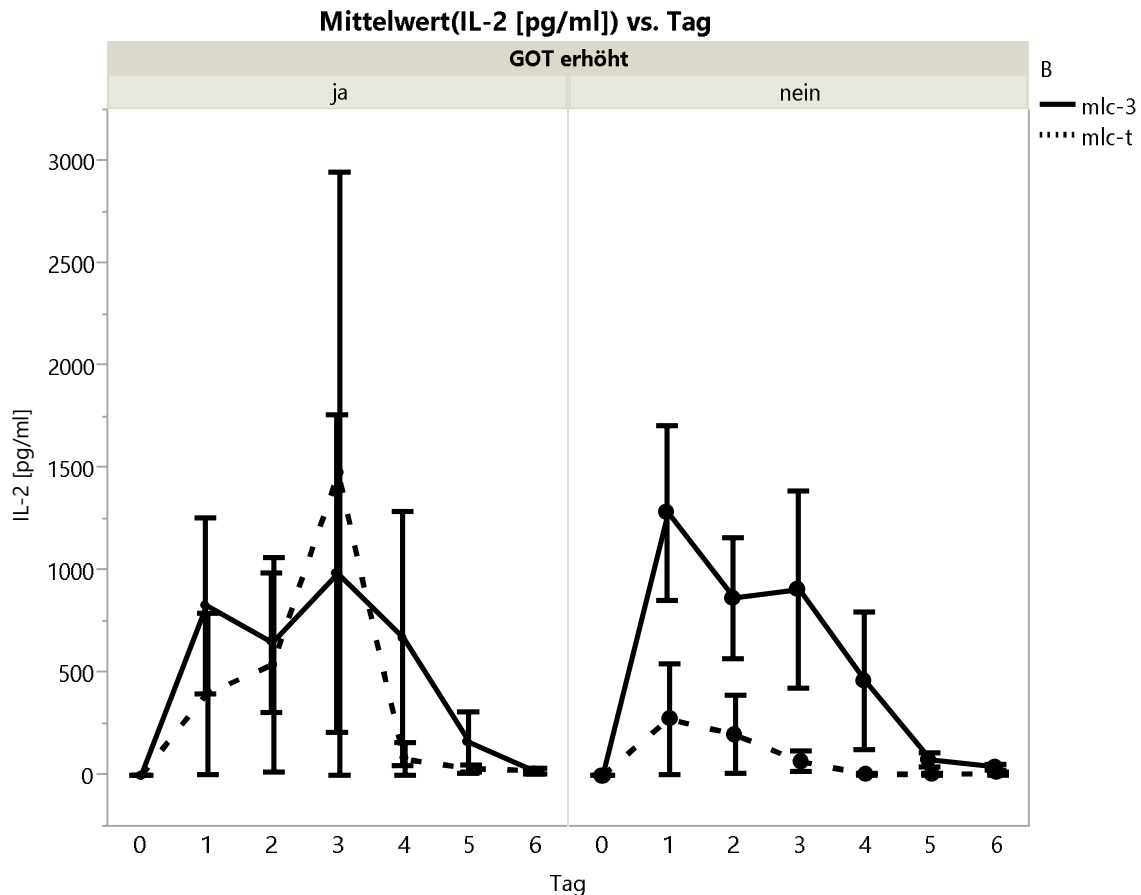


Abbildung 17

Verlauf der Mittelwerte und SEM von IL-2 in MLC-3 und MLC-t bei den Patientengruppen GOT erhöht (n=9) und GOT normwertig (n=14)

Die Gruppierung nach GOT-Erhöhung erbrachte nur für Patienten mit normwertiger GOT eindruckliche Ergebnisse bezüglich der gemessenen IL-2-Konzentrationen in der MLC-t und der MLC-3 (Abbildung 17): Die MLC-3 bildete an den Tagen 1 bis 4 im Mittel mindestens doppelt so viel IL-2 wie die MLC-t. Dagegen war das Bild bei den Patienten mit erhöhter GOT unüberschaubar und das Zytokinniveau weder in der MLC-t noch in der MLC-3 vorhersagbar. Insbesondere unterschied sich bei den beiden Gruppen die MLC-t, die in der Gruppe mit GOT-Erhöhung IL-2-Konzentrationen zwischen 0 und ca. 4200 pg/ml erreichte, in der anderen Gruppe nur maximal 2900 pg/ml und sich daher von der MLC-3 abgrenzen lässt.

4.2.2 Klinische Dokumentation

In den Abbildungen dieses Kapitels werden die Mittelwerte und SEM der Patienten mit bereits stattgehabter Abstoßung mit durchgängiger Linie

dargestellt, mit gepunkteter Linie die Mittelwerte und SEM der drei Patienten, die zum Blutentnahmezeitpunkt keine Abstoßungsreaktion erlitten haben.

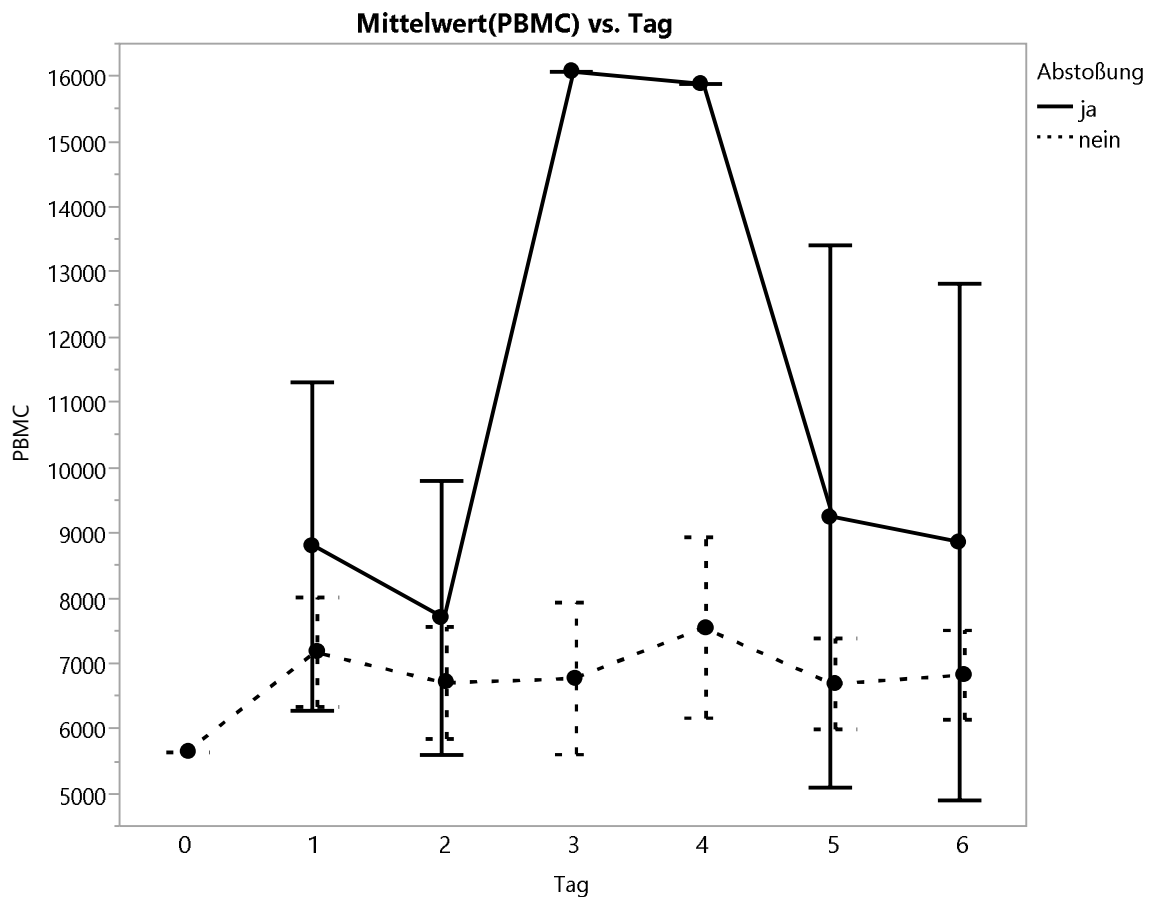


Abbildung 18
Mittelwerte und SEM der PBMC-Anzahl in den MLC-t über 6 Tage für Patienten mit und ohne klinisch stattgehabte Abstoßung.

Im sechstägigen Verlauf der PBMCs in den donorspezifischen Transplantat-MLCs (MLC-t) hatte der Abstoßer von Beginn an ein höheres PBMC-Niveau (Abbildung 18) als die Nicht-Abstoßer und erreichte im Gegensatz dazu ein Maximum am dritten und vierten Tag nach Ansetzen der MLCs (16080 und 15900 PBMCs). Danach fiel die PBMC-Anzahl in etwa wieder auf das Ausgangsniveau ab. Ein eindeutiger Unterschied zwischen den Abstoßern und den Nicht-Abstoßern war an Tag 3 zu verzeichnen. Die Nicht-Abstoßer hatten insgesamt einen recht konstanten PBMC-Verlauf in der Transplantat-MLC mit (bei größerem Stichprobenumfang) wesentlich geringeren Standardfehlern (vgl. Abbildung 5 Seite 27).

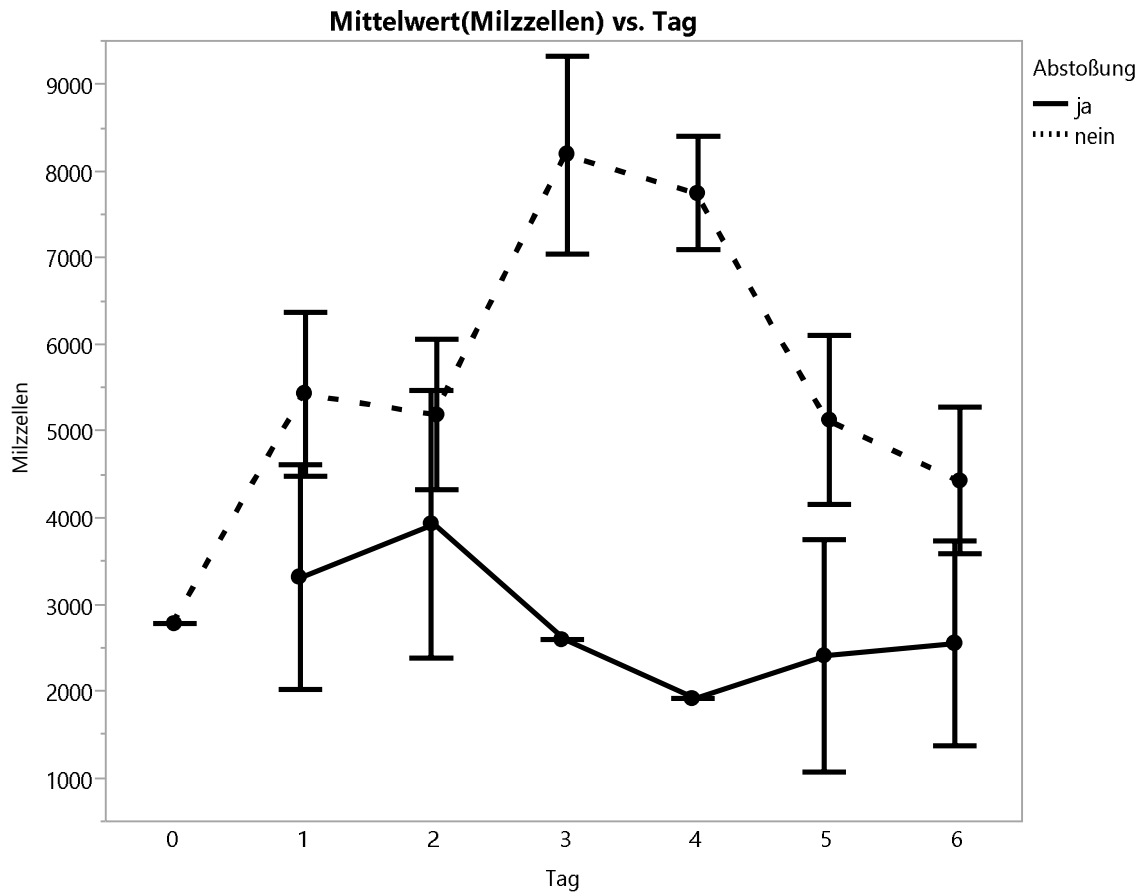


Abbildung 19
Mittelwerte und SEM der Anzahl der Milzzellen in der MLC-t für Patienten nach Abstoßung und für Patienten ohne Abstoßung.

Entgegengesetzt zu den PBMCs (Abbildung 18) stieg die Milzzellzahl bei den Nicht-Abstoßern an (Abbildung 19), um am dritten und vierten Tag ein Maximum zu erreichen (8193 Milzzellen, SEM \pm 1144 und 7759 Milzzellen, SEM \pm 653) und stellte sich danach auf dem Niveau des ersten und zweiten Tages wieder ein. In den MLC-t der Abstoßer sank die Anzahl der Milzzellen insgesamt eher ab, erreichte sogar zum Zeitpunkt des Maximums bei den Nicht-Abstoßern ein Minimum von 2606 bzw. 1929 Milzzellen. Am vierten Messtag hatten Abstoßer signifikant weniger Milzzellen in der Kultur gegen ihr Transplantat als Nicht-Abstoßer.

4.3 Immunsuppressionsregime

Calcineurininhibitoren (CNI) greifen erheblich in das Immunsystem ein. Dieses Kapitel zeigt Unterschiede im in-vitro Zytokinprofil von Patienten, die einen Calcineurininhibitor (z.B. Ciclosporin) einnehmen im Vergleich zu Patienten, die keine CNI-Medikation erhalten haben.

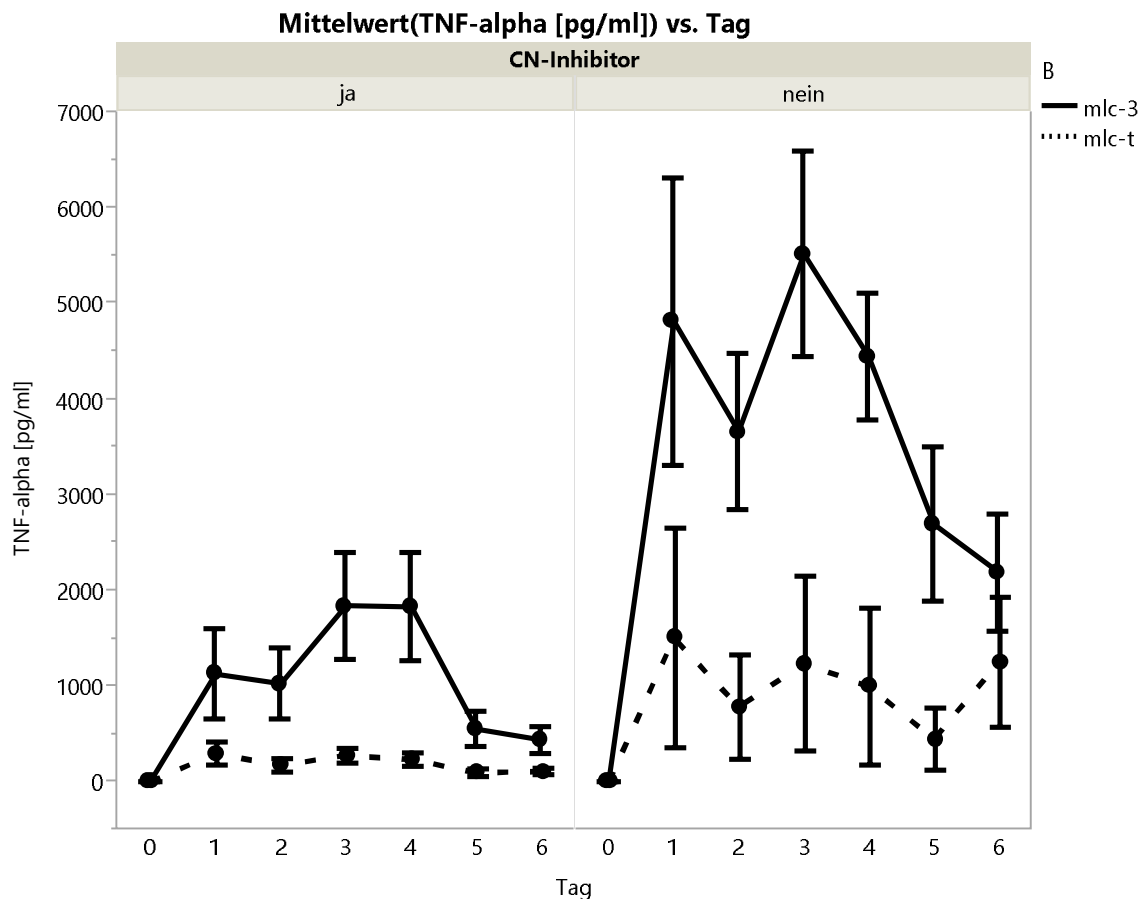


Abbildung 20

Mittelwerte und SEM der TNF- -Konzentration in MLC-t und MLC-3 gruppiert nach CNI-Medikation.

Die MLC-t von Patienten mit CNI-Medikation (Abbildung 20, links) bildete nur wenig TNF- , wohingegen die Zellen in der MLC-3 deutlich, wenn auch nicht signifikant mehr TNF- produzierten (vergleichbar mit IL-2). In der MLC-t lag der größte Mittelwert bei relativ konstantem Niveau bei 274 pg/ml, SEM \pm 112 an Tag 1; in der MLC-3 bei 1554 pg/ml, SEM \pm 512 an Tag 4.

Die Patienten ohne diese immunsuppressive Therapie (rechts in Abbildung 20)

wiesen im Vergleich zur links dargestellten Gruppe in ihren MLCs signifikant höhere TNF- -Konzentrationen auf, und zwar sowohl für die MLC-t an Tag 2, 5 und 6 als auch für die MLC-3 an allen Tagen. Innerhalb dieser Patientengruppe ohne CNi konnte wie oben kein signifikanter Unterschied zwischen den TNF- -Konzentrationen in MLC-t und MLC-3 gefunden werden. Trotzdem war TNF- in der MLC-3 durchschnittlich deutlich höher konzentriert (größter Mittelwert an Tag 3: 3188 pg/ml, SEM \pm 1239) als in der MLC-t (größter Mittelwert an Tag 3: 1235 pg/ml, SEM \pm 911).

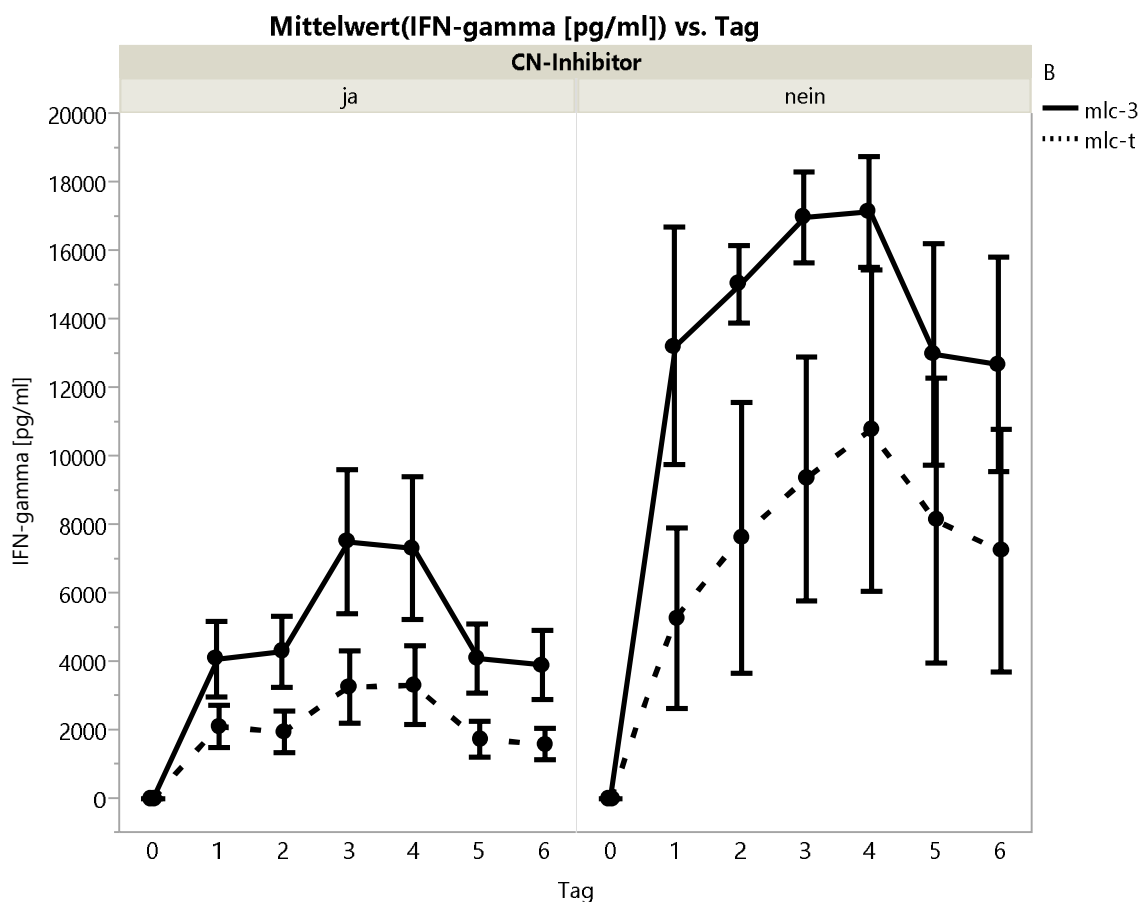


Abbildung 21
Mittelwerte und SEM der IFN- -Konzentration in MLC-3 und MLC-t gruppiert nach CNi-Medikation.

Wie TNF- wurde auch IFN- tendenziell in höherer Konzentration sowohl mit als auch ohne Calcineurininhibitoren in den MLC-3 als auch in den MLC-t gemessen (für beide Gruppen nicht signifikant, Abbildung 21).

Unter CNI-Medikation zeigte sich wieder der klassische Konzentrationsanstieg mit Maximalwerten an Tag 3 (Mittelwert MLC-3 5921 pg/ml, SEM \pm 1843; Mittelwert MLC-t 3261 pg/ml, SEM \pm 1057) und Tag 4 (Mittelwert MLC-3 6218 pg/ml, SEM \pm 1900; Mittelwert MLC-t 3320 pg/ml, SEM \pm 1153) und Rückgang auf das Ausgangsniveau an Tag 5 und 6. Ohne CNI-Medikation stiegen die mittleren Konzentrationen bis Tag 4 (Mittelwert MLC-3 11472 pg/ml, SEM \pm 3734; Mittelwert MLC-t 10767 pg/ml, SEM \pm 4699) schnell auf viel höhere Werte an und sanken danach auch wieder ab. Sie erreichten innerhalb des Messzeitraums für die MLC-t jedoch nicht wieder die Ausgangswerte. Ohne CNI-Medikation war IFN- in der MLC-3 an allen Messtagen signifikant höherkonzentriert, in der MLC-t an Tag 2, 5 und 6 (wie TNF-).

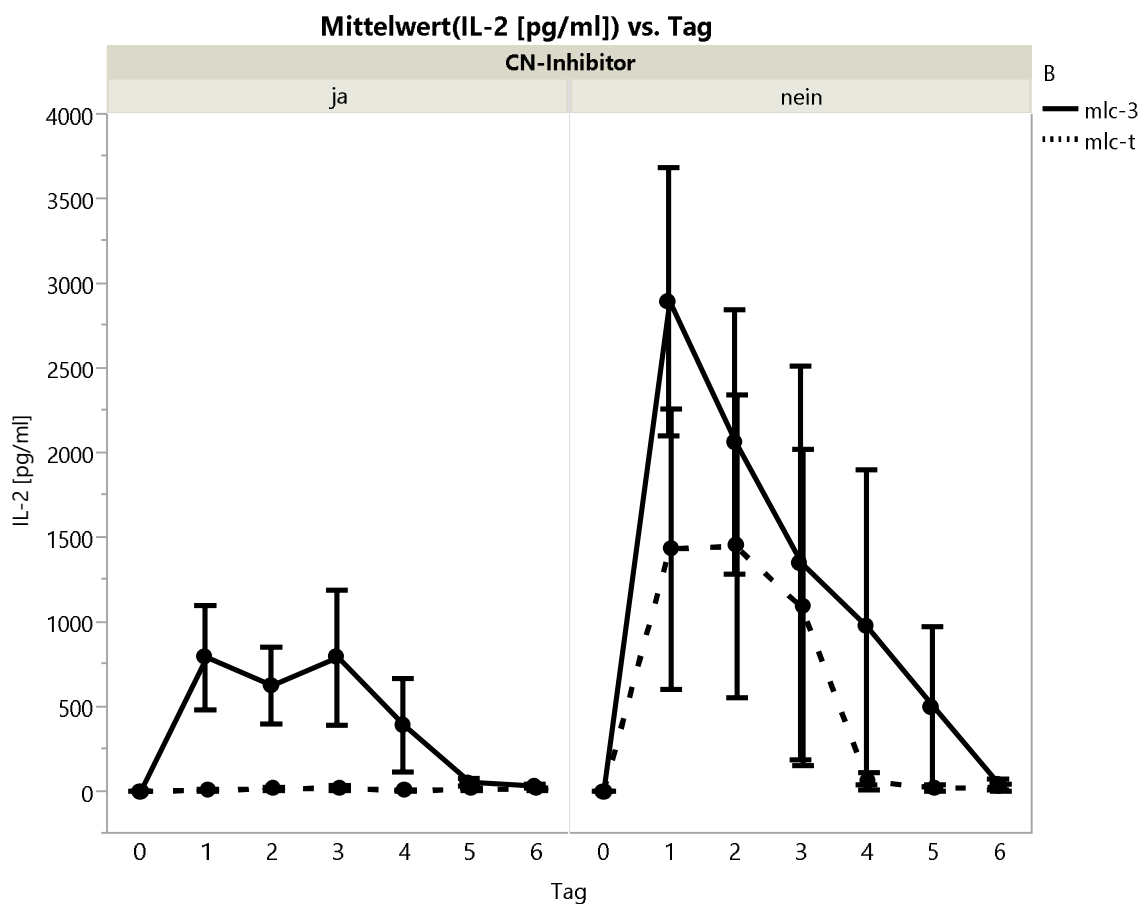


Abbildung 22
Mittelwerte und SEM der IL-2-Konzentration in MLC-3 und MLC-t für Patienten mit Calcineurininhibitormedikation (links) und ohne (rechts).

Nach CNI-Einnahme wurde in vitro quasi kein IL-2 auf donorspezifische Immunzellen produziert (höchster Mittelwert an Tag 3: 20 pg/ml, SEM \pm 14), jedoch mäßig gegen fremde Immunzellen in der MLC-3 zwischen Tag 1 und 4 mit Konzentrationen von durchschnittlich bis zu 633 pg/ml, SEM \pm 249 (Abbildung 22). In der Gruppe der Patienten mit CNI-Medikation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MLC-t und MLC-3 bezüglich der IL-2-Konzentration. In der zweiten Gruppe ohne CNI-Medikation waren die Messergebnisse insgesamt sehr inhomogen. Tendenziell wurden aber genau wie in der ersten Gruppe höhere IL-2-Konzentrationen in der MLC-3 als in der MLC-t gemessen, die Standardfehler waren aber sehr hoch. Im Gegensatz zu den Patienten mit CNI-Einnahme sezernierten die MLC-t-Zellen der anderen Gruppe deutlich messbar IL-2. Sowohl für die MLC-t als auch für die MLC-3 wurde eine IL-2-Konzentration mit hohem Standardfehler gemessen. Die Mittelwerte für beide Kulturen stiegen initial sehr stark an und zeigten dann bis zum sechsten Messtag eine rückläufige Tendenz. Signifikante Unterschiede zwischen MLC-t und MLC-3 konnten auch hier nicht gezeigt werden.

Vergleicht man die IL-2-Konzentrationen in den MLC-t zwischen den beiden Patientengruppen, so wird berechnet, dass die Konzentrationen in der MLC-t an Tag 1 und 2 unter CNI-Einnahme signifikant niedriger waren (Tag 1: 6 pg/ml, SEM \pm 4; Tag 2: 14 pg/ml, SEM \pm 8) als ohne CNI-Einnahme (Tag 1: 1147 pg/ml, SEM \pm 703; Tag 2: 1159 pg/ml, SEM \pm 752). Für die MLC-3 waren die Mittelwerte der IL-2-Konzentrationen sogar an Tag 1, 2 und 5 signifikant höher bei den Patienten ohne CNI-Therapie.

Patienten, die keine CNI einnehmen, bildeten in der MLC-t und MLC-3 kein IL-12p70. Wenn überhaupt, wurde dieses Zytokin nur von Patienten mit CNI-Therapie gebildet, intra- und interindividuell aber sehr schwankend. Es wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt.

An Tag 2 und 6 wurde in der MLC-t von Patienten ohne CNI-Medikation signifikant mehr IL-10 gebildet als bei Patienten mit CNI. In der MLC-3 waren die IL-10-Konzentrationen an Tag 1 und 2 signifikant höher für Patienten ohne

CNI-Einnahme. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit CNI-Einnahme waren die IL-10-Konzentrationen in der MLC-3 zwar tendenziell etwas höher als in der MLC-t, die Unterschiede waren aber an keinem Tag signifikant.

Bei durchschnittlich wesentlich höheren IL-10-Konzentrationen in den MLCs der Patienten ohne CNI waren die Differenzen zwischen MLC-3 und MLC-t bei großen Standardfehlern auch an keinem Tag signifikant.

Die IL-8-Werte zeigten bei Patienten mit CNI in der MLC-t und MLC-3 wieder typische Maxima an Tag 3 und 4, die Konzentrationen in den beiden Kulturen waren aber nicht signifikant unterscheidbar. Bei den anderen Patienten waren die IL-8-Werte ähnlich hoch, allerdings ohne das Maximum an Tag 3 und 4. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kulturen gemessen. Ähnlich verteilten sich die Konzentrationen von IL-6.

IL-4 war allgemein nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar, in der MLC-t wurde es nicht gebildet. Die Konzentrationen in der MLC-3 hatten relativ hohe Standardfehler.

In der MLC-t der Patienten mit CNI wurden über die sechs Messtage relativ konstant mittlere IL-5-Konzentrationen von etwa 100-150 pg/ml gemessen, in der MLC-3 war IL-5 nicht signifikant höherkonzentriert, das Durchschnittsmaximum lag an Tag 4 bei 736 pg/ml, SEM \pm 219. Bei den Patienten ohne CNI-Einnahme wurden durchschnittlich höhere und vom Betrag ähnliche IL-5-Konzentrationen in der MLC-t und MLC-3 gemessen, die Konzentrationsunterschiede waren aber nie signifikant. IL-5 war an Tag 5 und 6 in der MLC-t signifikant höherkonzentriert bei Patienten, die keine CNI einnehmen im Vergleich zu Patienten mit CNI. An Tag 1, 2, 5 und 6 waren die IL-5-Konzentration in der MLC-3 der Patienten ohne CNI signifikant höher als in der MLC-3 der Patienten mit CNI.

IL-1 β war in den MLC-3 im Mittel höherkonzentriert als in den MLC-t, außerdem wiesen die MLC der Patienten ohne CNI tendenziell auch höhere Konzentrationen, aber auch sehr große Standardfehler auf. Signifikante

Unterschiede gab es weder zwischen MLC-t und MLC-3, noch im Vergleich der beiden Patientengruppen.

TNF- β wurde in den MLC-3 der Patienten mit CNI mehr gebildet als in den MLC-t dieser Patienten, signifikant war der Unterschied jedoch nur an Tag 2. Für die MLC-3 zeigte sich wieder der klassische Verlauf mit mittleren Höchstwerten an Tag 3 und 4 (Tag 3: Mittelwert 687 pg/ml, SEM \pm 194; Tag 4: Mittelwert 651 pg/ml, SEM \pm 198), für die MLC-t zeigte sich ein konstanter Verlauf mit Konzentrationen von etwa 60-100 pg/ml.

Für die Patienten ohne CNI wurde gezeigt, dass auch in der MLC-3 höhere TNF- β -Werte gemessen wurden, signifikant mehr an Tag 1.

Signifikante Unterschiede zeigten sich v.a. zwischen den zwei Patientengruppen: ohne CNI-Einnahme war die TNF- β -Konzentration in den MLC-3 signifikant höher an Tag 1, 2, 5 und 6 als mit CNI-Einnahme. Für die MLC-t war dieser Vergleich nur an Tag 2, 5 und 6 signifikant.

5 Diskussion

Die mit Abstand häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation sind virale und äthyltoxische Leberzirrhosen. In Europa wurden zwischen 1990 und 2012 insgesamt 28467 Patienten mit diesen Grunderkrankungen transplantiert, im Vergleich dazu war Malignität mit nur 6645 Lebertransplantationen die zweithäufigste Indikation [50]. Insofern ist diese Studienpopulation bezüglich der Grunderkrankungen bei Lebertransplantierten in etwa repräsentativ. Ein möglicher Einwand an der Auswahl der Patienten ist, dass gar keine sicher klinisch toleranten Patienten teilgenommen haben. SOT-Patienten können und sollten in Folgestudien mitaufgenommen werden. Außerdem sollte die Zahl der teilnehmenden Patienten für Folge-Experimente höher sein.

In vitro herrschen sehr kontrollierte Bedingungen, insbesondere enthält das Kulturmedium anders als in vivo initial keinerlei Zytokine. Die in vitro Methode lässt das systemische Zytokin-Milieu in vivo außen vor. Das Spenderorgan selbst ist eine große Quelle für systemisches IL-10 und hat intrinsisches Potential zur Toleranzinduktion [21], die in der in vitro MLC mit PBMC nicht

berücksichtigt werden können. Ein häufiger Kritikpunkt an in vitro Methoden im Allgemeinen ist, dass viele Zellen in vitro anerg sind. Insbesondere trifft dies auch für CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen zu, die in vitro auf die gewöhnlichen Stimuli nicht zwangsläufig mit einer Proliferationsinduktion von Foxp3⁺ CD4⁺ T-Effektorzellen antworten [51, 52]. 5-10% der CD4⁺ Zellen in der Milz sind jedoch Foxp3⁺ T_{reg}s [53]. T_{reg}s können dann die Antwort von möglicherweise vorhandenen präexistenten T-Gedächtnis-Zellen nicht supprimieren [54].

Nach wie vor ist aber nicht geklärt, welche T-Milzzellen maßgeblich für den Milzzell-Chimärismus verantwortlich sind [29]. Daher kann uns in diesen in vitro Experimenten durch die Inaktivierung bzw. Anergie von T-Zellen eventuell eine Pseudotoleranz vorgegaukelt werden. Antigenpräsentation unter suboptimalen Bedingungen, wie beispielsweise durch andere T-Zellen und nicht durch APC, führt zur Inaktivierung der T-Zellen, weil die kostimulatorischen APC-Signale inhibiert sind [25]. In vivo unter optimalen Bedingungen wären die T-Zellen möglicherweise aktiv. Erwartungsgemäß sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen MLCs messbar gewesen, sodass funktionell nicht von einer höhergradigen Inaktivierung ausgegangen werden muss. Desweiteren wird bei der in vitro Methode eine ggf. von immunologischer Bedeutung vorliegende Grunderkrankung (z.B. aktive virale Hepatitis) nicht ausreichend berücksichtigt.

Da kein Vollblut verwendet wurde, fehlt in vitro auch die Komplementaktivierung, die normalerweise zu Abstoßung und Toleranz beiträgt. Jedoch wurde auch beschrieben, dass ein Lebertransplantat relativ resistent gegenüber antikörpervermittelten Abstoßungsmechanismen ist [55]. Außerdem wurde in diesem Versuchsaufbau nicht noch einmal explizit geklärt, welche Zellen die isolierten PBMC umfassen und ob nicht ggf. wichtige Zellen entfernt wurden. Man geht aber im Allgemeinen davon aus, dass bei dieser durchaus etablierten Gewinnung mittels Dichtegradienten Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten, Makrophagen und wenige dendritische Zellen gewonnen werden [56, 57].

Insgesamt bringen diese Methoden Nachteile mit sich, die bei der Komplexität der Transplantatimmunologie mit Einbeziehung des gesamten Organismus in

Kauf genommen werden müssen. Die Verwendung von PBMC kann das Lebermilieu zwar nicht berücksichtigen, bietet aber den eindeutigen Vorteil der Nicht-Invasivität. Bisher konnten auch invasive Verfahren noch keine prädiktiven Werte liefern und die Histopathologie nicht ersetzen. Die vielversprechendsten Experimente zum Toleranznachweis arbeiteten in der Regel mit Vollblut oder PBMC.

Da für die Kulturmedien FCS verwendet wurde, ist der Einwand berechtigt, dass FCS-Antigene stimulierend auf die Zellkulturen wirken. Das zugegebene FCS wurde auf ein Minimum reduziert und in Anbetracht der geringen Responsivität in der MLC-a scheint dieser Effekt insgesamt auch nur sehr gering auszufallen. Ein eventueller Vorteil an diesem Experimentaufbau liegt außerdem in der Verwendung kryokonservierter Milzzellen und der relativ langen Kultivierung. Es entstehen Zellfragmente, die für die indirekte Antigenerkennung sehr bedeutend sind. MLCs mit frischen Spenderzellen repräsentieren dagegen fast ausschließlich die direkte Antigenerkennung [58].

Gerade wenn es um die Untersuchung und Beurteilung inflammatorischer Zytokine geht, muss zwischen einem entzündlichen Geschehen und einer Abstoßung aufgrund unterschiedlicher Konsequenz sicher unterschieden werden. Bei dieser in vitro Methode ist im Gegensatz zu den Serummessungen davon auszugehen, dass nach der Inkubation und durch den Vergleich mit den Kontrollgruppen eine Entzündung abgegrenzt werden kann.

Ferner ist es schwierig, eine Kontrolle oder Referenz für abstoßungsgefährdete Patienten zu finden. Goldstandard wäre hier sicherlich die invasive Methode der Biopsieentnahme, die ohne klinischen Hinweis auf eine instabile Transplantatfunktion im Rahmen einer Studie schwierig zu rechtfertigen ist. Selbst wenn eine Biopsie durchgeführt wird, gibt sie zwar wertvolle Informationen über die Ursache einer Transplantatdysfunktion, kann aber die immunologische Entwicklung nicht vorhersagen. Hier wurde die MLC-3 als Vergleichswert für eine Abstoßung herangezogen und konnte sich bei mehreren Messungen etablieren. Es gibt darüber hinaus aber auch keine histologischen Kriterien für Toleranz. So hatten einerseits SOT-Patienten in ihrer Graft-Biopsie (Niere) vermehrt FoxP3+ Zellen [59], andererseits wurde auch das Gegenteil

gezeigt, nämlich dass bei akuter Abstoßung Foxp3+ Zellen erhöht waren [60]. Dies ist möglicherweise ein wichtiger Hinweis darauf, dass zwischen Spender- und Empfänger-T_{reg} differenziert werden muss und ein starkes Argument für die Chimärismus-These.

Als Kontrollmechanismen dienten in diesem Experiment daher zum einen die gängigen Laborwerte (v.a. GPT) als Parameter für die Leberfunktion sowie die drei Kulturarten: in der MLC-3 wird eine Abstoßung erwartet, in der MLC-a wird Toleranz erwartet. Die MLC-t umfasste die inhomogene, aber durchaus repräsentative Patientenmenge, bestehend aus Patienten mit stattgehabter Abstoßung und ohne Abstoßung.

Seit Jahrzehnten wird in der Transplantationsmedizin schon mit MLCs experimentiert. Dabei wird eine T-Zell-Expansion als Antwort auf Donor-Antigene als erhöhtes Risiko für eine Abstoßung gesehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Nierentransplantierte mit Hyporesponsivität in der MLC nach einem Jahr ein besseres Transplantatüberleben haben [58]. Erwartungsgemäß zeigen Patienten mit stattgehabter Abstoßung in der MLC gegen ihr Transplantat tendenziell höhere PBMC-Zahlen und niedrigere Milzzellzahlen als die Nicht-Abstoßer. Signifikant mehr PBMC als bei Nicht-Abstoßern wies die MLC-t des Patienten mit Abstoßung an Tag 3 und 4 auf. Außerdem wurden bei dem Patienten am vierten Tag signifikant weniger Milzzellen gemessen. Die Ergebnisse werden so gedeutet, dass in diesem Zytotoxizitätsassay die Milzzellen (also die Spenderzellen) bei Nicht-Abstoßern (möglicherweise toleranten Patienten) von ihren PBMC toleriert und nicht angegriffen werden. Bei den Abstoßern, die sicher nicht tolerant gegenüber ihrem Transplantat sind, überwiegen die spendereigenen PBMC, weil die Milzzellen als APC fungieren und eine Alloreaktion bewirken, worauf die PBMC mit Proliferation reagieren. Ähnliche Tendenzen ohne signifikante Unterschiede zeigten sich überraschenderweise sogar in der MLC-3, wo bei den Abstoßern ein höheres PBMC-Level gemessen wurde als bei den Nicht-Abstoßern. Möglicherweise haben Abstoßer eine höhere Grundaktivität ihrer PBMC als die Gruppe der Patienten, die noch keine Abstoßung erlitt. Dieses Ergebnis stützt die These des oben beschriebenen Stimulationsindex von de la Garza [49], der

beschreibt, dass Patienten mit einem hohen Risiko für eine Abstoßung einen höheren Stimulationsindex aufweisen. Die MLC repräsentiert ganz besonders die lymphatischen Mechanismen, d.h. die vermutliche Hauptkomponente des Abstoßungsgeschehens.

Anhand der FACS-Messung können Patienten mit hoher Responsivität und hohem Risiko für eine Abstoßung anhand erhöhter PBMC-Zahlen an Tag 3 und 4 identifiziert werden.

TNF- α , TNF- β und IFN- γ sind drei klassische inflammatorische Zytokine. IFN- γ ruft über Makrophagen und Monozyten eine Entzündungsreaktion hervor. TNF- α richtet sich u.a. gegen regulatorische T-Zellen. TNF- α . früher auch Lymphotoxin genannt . wird von aktivierten Lymphozyten sezerniert. TNF- α und TNF- β sind strukturell und funktionell homolog. Chemokine aus der TNF-Familie aktivieren in ein und derselben Zelle sowohl apoptotische Signale über Caspasen als auch antiapoptotische Signale über den NF- κ B-Signalweg und regulieren auf komplexe Art und Weise Zellwachstum, -überleben und Apoptose [61, 62]. Signifikant erhöhte Konzentrationen dieser drei Zytokine fanden sich in der MLC-3 verglichen mit der MLC-a sowie bei Abstoßern verglichen mit Nicht-Abstoßern an ein bis mehreren Messtagen. Diese Ergebnisse gehen einher mit denen von Imagawa et al., die bei Patienten mit stattgehabter akuter Abstoßung erhöhte TNF- α -Konzentrationen im Serum gemessen haben im Gegensatz zu Patienten mit stabilem klinischem Verlauf [63]. Wie erwartet ist die TNF- α -Konzentration bei voller Immunität, wie sie in der MLC-3 und bei dem Abstoßer vorausgesetzt wird, am höchsten. Die MLC-t, die größtenteils aus Nicht-Abstoßern bestand, weist niedrige Konzentrationen auf, die MLC-a nur minimal TNF- α . Die TNF- α -Konzentration des Abstoßers in seiner MLC-t von 2145pg/ml an Tag 3 entspricht dem gemessenen Mittelwert in der MLC-3 von 2364pg/ml an Tag 3. Bei dem Abstoßer ist von nachgewiesener Immunität gegen sein Transplantat auszugehen.

IL-6 als weiteres inflammatorisches Zytokin war in der MLC-3 und der MLC-t höherkonzentriert als in der MLC-a. IL-6 und TNF- α induzieren synergistisch eine maximale Alloimmunität und Resistenz der Effektorzellen gegen die supprimierende Wirkung der T_{reg} [36]. IL-4, IL-6 und IFN- γ inhibieren die

Konversion von Effektorzellen zu induzierten T_{regs} [64]. IL-4 wird insgesamt nur in geringer Konzentration gebildet, am meisten jedoch in der MLC-3. Passend dazu findet man außerdem in der Literatur, dass eine geringe IL-4-Produktion vor Nierenabstoßung schützt [65] und während einer akuten Abstoßung große Mengen IL-4 im Transplantat exprimiert werden [16]. IL-6 ist u.a. auch ein TH17-Effektorzytokin und ist bei Abstoßung im Tiermodell erhöht [22].

IL-8 wies in zwei bis drei MLC-Gruppen signifikant unterschiedliche Konzentrationen an den Tagen 2 bis 5 auf, die höchste in der MLC-a, gefolgt von der MLC-3 und die niedrigste in der MLC-t. In der Gruppe der Patienten mit GPT-Erhöhung zeigte sich eine relativ konstante IL-8-Produktion, bei den Patienten ohne GPT-Erhöhung signifikant mehr IL-8 in der MLC-t an Tag 3 als in der anderen Gruppe. Geht man davon aus, dass in der MLC-a und bei Patienten ohne GPT-Erhöhung keine hohe Immunaktivität stattfindet und erst recht keine inflammatorische, sind diese Ergebnisse nur schwer mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von IL-8 in Einklang zu bringen.

IL-8 wird klassischerweise von Phagozyten gebildet und aktiviert Neutrophile. Es wird in infektiösem, inflammatorischem, ischämischem oder traumatischem Milieu gebildet [66]. IL-8 ist an Angiogenese, Tumorprogression, Gewebe-Remodelling und Mitose beteiligt. Von nicht-induzierten Zellen wird es kaum gebildet, wohl aber als Antwort auf proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF und als Reaktion auf zellulären Stress. Die Latenzzeit vom Reiz bis zur IL-8-Expression ist sehr kurz [67]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass bei Nierentransplantatierten mit initial relativ schlechter Kreatininverbesserung nach Transplantation und/oder verzögerter Transplantatfunktion weniger IL-8-Transkripte in PBMC messbar waren als bei Patienten mit guter Transplantatfunktion. Eine schlechte Transplantatfunktion ist zwar nicht direkt mit einer Abstoßung gleichzusetzen, das Serum-IL-8 war bei Patienten mit Nierenabstoßung aber auch nicht erhöht. Bei langer Ischämiezeit - also auch einer Art von zellulärem Stress - hingegen wurden hohe IL-8-Konzentrationen gemessen. *Borst et al.* vermuten, dass unterschiedliche Dynamiken der IL-8 Transkription über das Ausmaß der PBMC-Attraktion in geschädigtes Gewebe entscheiden und somit teils widersprüchliche Aussagen über die

Eigenschaften von IL-8 getroffen werden [68]. Diese Untersuchungsergebnisse stützen unsere Messwerte, die in der MLC-a signifikant hohe IL-8 Werte ergaben. Dass die MLC-3 die zweithöchsten Konzentrationen aufwies, kann vielleicht so erklärt werden, dass hier tatsächlich ein inflammatorischer Reiz vorlag. IL-1 und TNF- α waren hier ja höherkonzentriert als in der MLC-a und MLC-t und induzieren die IL-8-Transkription. In der Literatur wird auch angegeben, dass IL-6 und IL-8 ähnlich reguliert werden. In diesem Experiment zeigen sie aber kein ähnliches Verhalten.

Der Zusammenhang zwischen IL-10 und IL-2 und die immunsuppressive Wirkung von IL-10 sind schon lange erforscht. Die zwei Interleukine sind klassische Gegenspieler. IL-10 inhibiert partiell, aber direkt die Proliferation von T-Zell-Klonen, die zur IL-2-Freisetzung führen. IL-10 kann jedoch schon durch geringe Mengen IL-2 neutralisiert werden (IL-4 hingegen ist ineffektiv). Keinen Einfluss zeigt IL-10 auf IL-4, IL-5 und IFN- γ [69]. Obwohl IL-10 als tolerogen und IL-2 als inflammatorisch bekannt sind, konnten in diesen Experimenten keine richtungsweisenden Ergebnisse bezüglich der Abstoßungsgefahr gemessen werden. Unter Ausschluss zweier Ausreißer wurden die IL-10-Ergebnisse, die für alle Patienten eher inhomogen waren, zwar weiterhin nicht signifikant, jedoch wurde jetzt ähnlich viel IL-10 in MLC-a und MLC-t gebildet. Am meisten IL-10 wurde erstaunlicherweise aber in der MLC-3 gemessen. Im Gegensatz dazu gibt es z.B. eine Studie, die zeigte, dass lebertransplantierte Kinder mit hohem IL-10 und niedrigem TNF- α geringere Dosen Immunsuppressiva benötigen [39]. IL-10 wird auch von Kupffer-Zellen nach Exposition gegenüber LPS sezerniert und wirkt antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Außerdem sezernieren CD4⁺ CD25⁺ Treg IL-10 [25, 70]. Bei den Patienten mit GPT-Erhöhung zeigt sich in den MLC-t (nicht signifikant) mehr IL-2 und IL-10 als bei den Patienten mit normwertiger GPT, Maxima zeigten sich jeweils um den dritten und vierten Tag. Die GPT-Erhöhung deutet auf einen Leberschaden, möglicherweise infolge einer (subklinischen) Abstoßung hin. Die Ergebnisse müssen mit Vorsicht behandelt werden, da diese klinisch gebräuchlichen Leberfunktionstests bezüglich der Histopathologie, die nach wie vor als Goldstandard gilt, weder besonders

sensibel noch spezifisch sind [16]. IL-2 spielt eine bedeutende Rolle bei den Effektormechanismen, zeigt hier aber leider keine signifikanten Ergebnisse. Nach Stimulation von IL-2-Rezeptor tragenden T-Zellen kommt es zur Proliferation und Differenzierung der B- und T-Zellen, die daraufhin u.a. die proinflammatorischen Zytokine IFN- und TNF- sezernieren. Vielleicht gerade weil es eine so grundlegende und richtungsweisende Rolle in der Stimulation von Zytotoxizität spielt und vielfältig reguliert ist und hier zusätzlich der Effekt der CNI-Therapie noch messbar ist, können innerhalb der drei MLCs keine homogenen Konzentrationen gemessen werden.

Die Ergebnisse zeigen einen eindeutigen Unterschied der Zytokinkonzentrationen in MLC-t und MLC-3 zwischen Patienten mit und ohne CNI-Therapie. Dieser Effekt sollte eigentlich durch die Inkubation der PBMC umgangen werden. Patienten, die mit CNI therapiert wurden, hatten aber im Vergleich zu den Patienten ohne CNI signifikant verminderte Konzentrationen von IFN- , TNF- und TNF- in den MLC-t und MLC-3 an zwei oder mehr Messtagen. Außerdem waren IL-2 und IL-10 signifikant vermindert. Eine Erklärung für die gemessenen IL-2 Ergebnisse kann sein, dass trotz der fünftägigen Inkubation bei einem Teil der Patienten noch ein immunsuppressiver Effekt durch die Calcineurininhibitoren zur Geltung kommt. CNI hemmen unter anderem die IL-2-Transkription. Dafür spricht auch, dass bei Patienten ohne CNI-Therapie sowohl in der MLC-t als auch in der MLC-3 höhere TNF- , IFN- und IL-2-Mengen gemessen wurden. IL-2 wurde in der MLC-t der CNI-Patienten quasi gar nicht gebildet. Die MLCs der Patienten mit CNI-Medikation produzieren signifikant weniger dieser proinflammatorischen Zytokine. Ob diese Ergebnisse nach längerer Inkubation anders ausgefallen wären und die CNI-Effekte hätten ausgewaschen werden können, oder ob es sich um eine langfristige Veränderung der CNI-Zielzellen auf genetischer Ebene handelt, ist unklar.

Die Methoden zur Identifikation toleranter Transplantationspatienten sollte sich nicht allein auf den Empfänger beziehen, sondern wie hier geschehen die Spenderantigene und Spenderimmunzellen miteinbeziehen, da sich bei Versuchen der Toleranzinduktion gezeigt hat, dass die induzierte Toleranz

spezifisch für ein Alloantigen ist und fremde Antigene in donorspezifisch-toleranten Empfängern abgestoßen werden [71].

Ein eindeutiger Vorteil der Reduktion der Immunsuppressiva konnte noch nicht wirklich nachgewiesen werden, andererseits können aktuelle Immunsuppressiva aber auch keine chronische Abstoßung verhindern [39]. Biopsien toleranter kindlicher Patienten wiesen einen höheren Fibrosegrad auf. Nach Wiederaufnahme der immunsuppressiven Therapie verbesserte sich die vermutlich antikörpervermittelte Fibrose. Möglicherweise ist die Transplantatfibrose aber auch nur eine sAlterserscheinung%. Die Kontrollgruppe hatte einen wesentlich kürzeren Nachsorgezeitraum [45].

Die Ergebnisse dieser Experimente tragen dazu bei, prospektive Studien bei Patienten mit geringem Risiko für eine Abstoßung anzulegen, indem diese Niedrig-Risiko-Patienten identifiziert werden. Sie können teilweise erklären, was auf Zell-Zell-Ebene beim in vitro Chimärismus vorgeht. Wenn die Versuche mit mehr Patienten weitergeführt werden, können Messungen vor allem am dritten und vierten Tag erfolgen. Höhere Patientenzahlen zeigen dann vorab, ob anhand des Zytotoxizitätsassays bereits Patienten mit hohem Risiko, d.h. mit hohen PBMC und niedrigen Milzzellen, von weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise dem Interleukin-ELISA ausgeschlossen werden können. Ergänzend können z.B. noch IL-17, IL-35 und TGF- gemessen werden, die zum Teil von den bisher weniger berücksichtigten und fraglich involvierten Th17-Zellen produziert werden. Da der Vorteil einer Immunsuppressivareduktion nicht sicher belegt ist, muss im Einzelfall weiterhin zwischen Morbidität und Transplantatüberleben abgewogen werden.

6 Zusammenfassung

Die lebenslängliche immunsuppressive Therapie nach Organtransplantationen geht oft mit erheblichen Nebenwirkungen einher und steigert die Morbidität und Mortalität. In der Transplantationsmedizin ist es daher von großem Interesse tolerante Patienten zu identifizieren, um sie risikoarm von der Immunsuppression zu entwöhnen oder Toleranzinduktionsschemata kontrollieren zu können. Diese Studie verfolgt einen donorspezifischen Ansatz zur Toleranzmessung, bei dem in einer gemischten Leukozytenkultur aus peripheren Blutzellen (PBMC) des lebertransplantierten Empfängers und kryokonservierten Spendermilzzellen (MLC-t) die Zytotoxizität und Reaktivität anhand lebender und vitaler Zellen und anhand der Zytokinkonzentrationen über sechs Tage gemessen werden. Als Vergleich dienen autologe Kulturen (MLC-a) ausschließlich aus spendereigenen Zellen und Kulturen aus Spenderblutzellen und Milzzellen eines völlig fremden Spenders (MLC-3). Es wurde ein Zytotoxizitätsassay etabliert, bei dem mittels FACS-Messung Patienten mit hoher Responsivität auf die Spendermilzzellen und hohem Risiko für eine Abstoßung durch erhöhte PBMC-Zahlen in der MLC-t identifiziert werden können. Außerdem fielen Patienten mit klinisch stattgehabter Abstoßung durch aussagekräftige Zytokinprofile auf. Klassische, abstoßungsassoziierte Zytokine wie TNF- α , TNF- β und IFN- γ fanden sich in erhöhten Konzentrationen in der MLC-3 und bei Abstoßern. Interessanterweise wies die MLC-a eine signifikant höhere IL-8-Konzentration als die MLC-t und die MLC-3 auf, was neue Fragen und Aspekte dieses bisher inflammatorisch assoziierten Zytokins aufwirft. Auch der Einfluss der immunsuppressiven Therapie mit Calcineurininhibitoren (CNI) war in den Kulturen trotz fünftägiger Inkubation noch messbar. Die MLCs der Patienten mit CNI-Medikation wiesen signifikant niedrigere Konzentrationen von TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-2, IL-10 und IL-5 auf. Patienten mit einem hohen Risiko für eine Abstoßung können anhand dieser Untersuchungen identifiziert werden und auch für Niedrig-Risiko-Patienten gibt es Hinweise in den Zytokinprofilen. Stellt sich klinisch die Frage einer Reduktion der Immunsuppressiva muss im Einzelfall aber weiterhin zwischen Transplantatüberleben und Morbidität abgewogen werden.

7 Abkürzungen

AICD . Activation induced Cell Death

APC . Antigen präsentierende Zelle

CD . Cluster of Differentiation

CNI . Calcineurininhibitor

CTLA-4 . Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DC . Dendritische Zelle

DIO - 3,3qDioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat

ELISA . Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FACS . Fluorescence Activated Cell Sorting

FADD - Fas-associated death domain protein

GOT . Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

GPT . Glutamat-Pyruvat-Transaminase

HCC . Hepatozelluläres Carcinom

HLA . Human Leukocyte Antigen

IFN . Interferon

IL . Interleukin

LSEC - liver sinusoidal endothelial cell

LPS - Lipopolysaccharid

MLC . Mixed Lymphocyte Culture

MHC . Major Histocompatibility Complex

PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells

PI - Propidiumiodid

PI3 . Phosphoinositid-3-Kinase

SEM . Standard Error of the Mean (Standardfehler)

TCR . T-Zell-Rezeptor

TNF . Tumornekrosefaktor

TRADD - TNF receptor type 1 associated death domain protein

8 Literaturverzeichnis

1. Starzl, T.E., et al., *Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance*. Hepatology, 1993. **17**(6): p. 1127-52.
2. Suthanthiran, M., *Transplantation tolerance: fooling mother nature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12072-5.
3. Ashton-Chess, J., et al., *Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation*. Transplantation, 2007. **84**(10): p. 1215-9.
4. Girlanda, R. and A.D. Kirk, *Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(8): p. 2242-51.
5. Dantal, J. and J.P. Soulillou, *Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation*. N Engl J Med, 2005. **352**(13): p. 1371-3.
6. Romagnoli, J., et al., *Posttransplant diabetes mellitus after kidney transplantation with different immunosuppressive agents*. Transplant Proc, 2004. **36**(3): p. 690-1.
7. Gonwa, T.A., et al., *End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment*. Transplantation, 2001. **72**(12): p. 1934-9.
8. Mazariegos, G.V., et al., *Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients*. Transplantation, 1997. **63**(2): p. 243-9.
9. Starzl, T.E., T.L. Marchioro, and W.R. Waddell, *The Reversal of Rejection in Human Renal Homografts with Subsequent Development of Homograft Tolerance*. Surg Gynecol Obstet, 1963. **117**: p. 385-95.
10. Wiesner, R.H., et al., *Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 638-45.
11. Demetris, A.J., et al., *Real-time monitoring of acute liver-allograft rejection using the Banff schema*. Transplantation, 2002. **74**(9): p. 1290-6.

-
12. Ramos, H.C., et al., *Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients*. Transplantation, 1995. **59**(2): p. 212-7.
 13. Mazariegos, G.V., et al., *Weaning of immunosuppression in long-term recipients of living related renal transplants: a preliminary study*. Transplant Proc, 1995. **27**(1): p. 207-9.
 14. Demetris, A., et al., *Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel*. Hepatology, 2000. **31**(3): p. 792-9.
 15. Demetris, A.J., et al., *Monitoring of human liver and kidney allograft tolerance: a tissue/histopathology perspective*. Transpl Int, 2009. **22**(1): p. 120-41.
 16. Germani, G., et al., *Markers of acute rejection and graft acceptance in liver transplantation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(4): p. 1061-1068.
 17. Murphy, K.P., *Janeway's Immunobiology*. 8. ed. ed2012, London [u.a.]: Garland Science. XIX, 868 S.
 18. Benseler, V., et al., *The liver: a special case in transplantation tolerance*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(2): p. 194-213.
 19. Priyadharshini, B., D.L. Greiner, and M.A. Brehm, *T-cell activation and transplantation tolerance*. Transplant Rev (Orlando), 2012. **26**(3): p. 212-22.
 20. Li, X.C., D.M. Rothstein, and M.H. Sayegh, *Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 271-93.
 21. Yang, Z.F., et al., *Induction of long-term liver allograft survival by delayed immunosuppression is dependent on interleukin-10*. Liver Transpl, 2007. **13**(4): p. 571-8.
 22. Shalev, I., et al., *Role of regulatory T cells in the promotion of transplant tolerance*. Liver Transpl, 2012. **18**(7): p. 761-70.
 23. Bishop, G.A. and G.W. McCaughan, *Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy*. Liver Transpl, 2001. **7**(3): p. 161-72.

-
24. Murakami, T., A.B. Cosimi, and T. Kawai, *Mixed chimerism to induce tolerance: lessons learned from nonhuman primates*. Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**(1): p. 19-24.
 25. Crispe, I.N., et al., *Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance*. Immunol Rev, 2006. **213**: p. 101-18.
 26. Wu, S.L. and C.E. Pan, *Tolerance and chimerism and allogeneic bone marrow/stem cell transplantation in liver transplantation*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(36): p. 5981-7.
 27. Donckier, V., et al., *Early immunosuppression withdrawal after living donor liver transplantation and donor stem cell infusion*. Liver Transpl, 2006. **12**(10): p. 1523-8.
 28. Starzl, T.E., et al., *Cell migration, chimerism, and graft acceptance*. Lancet, 1992. **339**(8809): p. 1579-82.
 29. Yamazaki, S., A. Kanamoto, and T. Takayama, *Donor-specific tolerance induction in organ transplantation via mixed splenocytes chimerism*. Clin Exp Immunol, 2013. **173**(2): p. 173-8.
 30. Starzl, T.E., *Chimerism and tolerance in transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14607-14.
 31. Kawai, T., et al., *HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression*. N Engl J Med, 2008. **358**(4): p. 353-61.
 32. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, *Actively acquired tolerance of foreign cells*. Nature, 1953. **172**(4379): p. 603-6.
 33. Kashiwagi, N., et al., *Studies of homograft sex and of gamma globulin phenotypes after orthotopic homotransplantation of the human liver*. Surg Forum, 1969. **20**: p. 374-6.
 34. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
 35. VanBuskirk, A.M., M.E. Wakely, and C.G. Orosz, *Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection*. Transplantation, 1996. **62**(2): p. 229-38.

-
36. Goldstein, D.R., *Inflammation and transplantation tolerance*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(2): p. 111-5.
 37. Kim, C.H., *FOXP3 and its role in the immune system*. Adv Exp Med Biol, 2009. **665**: p. 17-29.
 38. Pons, J.A., et al., *FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal*. Transplantation, 2008. **86**(10): p. 1370-8.
 39. Castellaneta, A., et al., *Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 28-34.
 40. Bastani, B., *Selective disappearance of donor-specific antibodies and absence of acute rejection after liver transplantation in a patient with a strongly positive lymphocyte crossmatch*. Arch Iran Med, 2006. **9**(2): p. 163-4.
 41. Kamada, N., H.S. Davies, and B. Roser, *Reversal of transplantation immunity by liver grafting*. Nature, 1981. **292**(5826): p. 840-2.
 42. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation*. J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 801-17.
 43. Warren, A., et al., *T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells*. Hepatology, 2006. **44**(5): p. 1182-90.
 44. Levitsky, J., *Operational tolerance: past lessons and future prospects*. Liver Transpl, 2011. **17**(3): p. 222-32.
 45. Sawitzki, B., et al., *State of the art on the research for biomarkers allowing individual, tailor-made minimization of immunosuppression*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(6): p. 691-6.
 46. Sakai, H., et al., *Potential benefit of mixed lymphocyte reaction assay-based immune monitoring after living donor liver transplantation for recipients with autoimmune hepatitis*. Transplant Proc, 2014. **46**(3): p. 785-9.
 47. Tanaka, Y., et al., *Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients*. Transplant Proc, 2012. **44**(2): p. 555-9.

-
48. Lindemann, M., et al., *Alloreactivity in recipients prior to and post living kidney and liver transplantation*. Scand J Immunol, 2011. **73**(4): p. 344-5.
 49. de la Garza, R.G., et al., *Trial of complete weaning from immunosuppression for liver transplant recipients: factors predictive of tolerance*. Liver Transpl, 2013. **19**(9): p. 937-44.
 50. *Original Disease (Liver)*. Available from: <http://www.ctstransplant.org/servlet/ArchiveServlet?group=L-75101E-0214&archivemode=false&ts=1405692060826>.
 51. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 7-13.
 52. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
 53. Spoerl, S. and X.C. Li, *Regulatory T cells and the quest for transplant tolerance*. Discov Med, 2011. **11**(56): p. 25-34.
 54. Yang, J., et al., *Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19954-9.
 55. Demetris, A.J., et al., *Immunopathology of antibodies as effectors of orthotopic liver allograft rejection*. Semin Liver Dis, 1992. **12**(1): p. 51-9.
 56. Jaatinen, T. and J. Laine, *Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 2**: p. Unit 2A 1.
 57. Fuss, I.J., et al., *Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood*. Curr Protoc Immunol, 2009. **Chapter 7**: p. Unit7 1.
 58. Mehrotra, A., et al., *Monitoring T cell alloreactivity*. Transplant Rev (Orlando), 2014.
 59. Brown, K., et al., *Ultra-localization of Foxp3+ T cells within renal allografts shows infiltration of tubules mimicking rejection*. Am J Pathol, 2007. **171**(6): p. 1915-22.
 60. Veronese, F., et al., *Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection*. Am J Transplant, 2007. **7**(4): p. 914-22.

-
61. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(8): p. 1403-8.
 62. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
 63. Imagawa, D.K., et al., *The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation*. *Transplantation*, 1990. **50**(2): p. 219-25.
 64. Degauque, N., et al., *Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 735-41.
 65. Uboldi de Capei, M., et al., *Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors*. *Transplantation*, 2004. **77**(4): p. 548-52.
 66. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. *FEBS Lett*, 1992. **307**(1): p. 97-101.
 67. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(5): p. 847-55.
 68. Borst, C., et al., *Interleukin-8 transcripts in mononuclear cells determine impaired graft function after kidney transplantation*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0117315.
 69. de Waal Malefyt, R., H. Yssel, and J.E. de Vries, *Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation*. *J Immunol*, 1993. **150**(11): p. 4754-65.
 70. Cabillic, F., et al., *Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response*. *J Hepatol*, 2006. **44**(3): p. 552-9.
 71. Graca, L., S.P. Cobbold, and H. Waldmann, *Identification of regulatory T cells in tolerated allografts*. *J Exp Med*, 2002. **195**(12): p. 1641-6.

9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie (Institut für experimentelle Chirurgie) unter Betreuung von PD Dr. Martin Schenk durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgt in Zusammenarbeit mit PD Dr. Martin Schenk und Dr. Karolin Thiel.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Seitzer (MTA) von mir eigenständig durchgeführt. Die Bestrahlung der Milzzellen erfolgte in der Transfusionsmedizin.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 12.07.2016